

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

KLASİK VE PULSE RADYOFREKANS TERMOKOAGÜLASYONUN
NÖROABLATİF ETKİLERİNİN
NÖRONAL DİZİN HÜCRELERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Berna KİPİCİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İdil TEKİN

Manisa, 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitim süresince yetişmemde büyük emekleri olan tüm hocalarıma, tez danışmanım sayın Prof. Dr. İdil TEKİN'e, tezimde büyük emeği olan Histoloji ve Embriyoloji A.D öğretim üyelerinden Doç. Dr. İbrahim TUĞLU'ya, zor günlerimde beni hiç yalnız bırakmayan, çok sevdiğim dostum sevgili Dr.Dilber KUMRAL', desteğiyle, sevgisiyle, sabrıyla hep yanımda olan hayat arkadaşım Ahmet KİPİCİ'ye ve beni yetiştiren canım aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

I- Giriş

II- Genel Bilgiler

a- RF Uygulamalarının Tarihçesi

b- RF Uygulamaları

1- Konvansiyonel RF

2- Pulsed RF

c- Konvansiyonel ve Pulsed RF Uygulamalarının Karşılaştırılması

d- Nöron Kültürü

e- Nörotoksisite

f- Oksidatif Stres

g- Oksidatif Stres ve Apoptosis

h- Programlanmış Hücre Ölümü

III- Gereç ve Yöntem

IV- Bulgular

V- Tartışma

VI- Sonuç

VII- Özet

VIII- Summary

IX- Kaynaklar

KISALTMALAR

IASP	Uluslararası Ağrı Araştırmaları Teşkilatı
KRF	Konvansiyonel Radyofrekans Termokoagölasyon
PRF	Pulse Radyofrekans
DREZ	Arka kök giriş bölgesi (Dorsal Root Entry Zone)
EMF	Elektro Manyetik Alan
ATP	Adenozin trifosfat
EM	Elektron mikroskopi
IM	Işık mikroskopi
PBS	Fizyolojik tamponlu solüsyon
HE	Hematoksilen- Eosin
TEM-Zeiss	Transmission Electron Microscope
VAS	Vizüel Ağrı Skalası
DRG	Dorsal Root Ganglion
NOS	Nitrik oksit sentetaz
nNOS (NOS- 1)	Nöronal Nitrik Oksit
iNOS (NOS- 2)	İndüklenebilir Nitrik Oksit
eNOS (NOS- 3)	Endotelial Nitrik Oksit
cNOS	Yapısal Nitrik Oksit
ATP	Adenozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH	Hidroksil

SSC	Saline Sodium Citrate
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
AIF	Apopitozis indükleyici faktör
PARP	Poli ADP-ribose polymeraz- 1
EndoG	Endonükleaz G
PTP	Permeabilite geçirgenlik poru
IFN	İnterferon
CARD	Kaspaz-gerektiren domain
DD	Ölüm domaini
DED	Ölüm efektör domaini
DISC	Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
AO	Akridin-orange
EB	Edityum-bromid
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling
FITC	Floresan izotiyosiyanat

I- GİRİŞ

RF termokoagülasyon 1965'ten bu yana (1), nöroablasyon yaratarak ağrı iletimini durdurmak amacıyla kronik ağrı sendromlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Konvansiyonel RF (KRF)'de yüksek ısı ile oluşturulan bu nöroablasyon; nörit benzeri reaksiyonlara, motor defisitlere ve deafferantasyon sekeline neden olabilmektedir. Yan etkilerin azaltılması amacıyla devam eden yeni arayışlar, 1996 yılında Sluijter'ın pulse RF (PRF)'i bulmasıyla sonuçlanmıştır. Sinir dokularında termokoagülasyona neden olan ısı oluşumunun, klinikte görülen sonuçlardan sorumlu olduğu düşünülmesine rağmen, PRF, destrüktif düzeyde ısı üretiminin olmadığı RF akımı oluşturmaktadır. PRF klinik olarak kanıtlanan etkinliği ve herhangi bir kalıcı nörolojik defisit yapmaması nedeniyle hızlı bir şekilde kabul edilmiş ve benimsenmiştir (2-9). Elde edilen klinik sonuçlar PRF'nin kullanımını desteklese de, etki mekanizması hala belirsizdir.

Bu çalışmada amaç, nöroblastoma hücre dizininde, nörotoksisite tarama testi, apoptos ve oksidatif stres immünohistokimyası kullanarak, RF tedavisinin nöron hücre davranışı üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Nöron hasarı nörit uzamasının inhibisyonundan başlayarak, hücre intiharı olan apoptosise kadar giden bir süreç olup, nitroz oksit üzerinden gerçekleşen oksidatif stres, bu davranışın en önemli bileşenini oluşturmaktadır. Bu nedenle RF uygulaması ile nöron üzerinde oluşacak oksidatif stres ve neden olacağı nörit inhibisyonu ile apoptos düzeyi arasındaki ilişki, bu uygulamaların gelecekteki kullanımlarının yönlendirilmesi anlamında önemli bilgiler edinmemizi sağlayacaktır.

RF uygulamalarının nöron üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında üç boyutlu in vivo ortam, ancak, belirgin toksik etkinin gösterilmesinde uygun olmakta ve kullanılan

mekanizmaların anlaşılmasında zorluklar oluşturmaktadır. Bu nedenle iki boyutlu, in vivo ortamın kompleksliğinden arındırılarak, basit ve mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına imkan veren, in vitro kültür ortamlarının kullanılması gerekli olmaktadır. Bu ortamlar, RF uygulamalarının özellikle PRF'in nöron davranışına olan etkilerini araştırmak, uygulamanın olası zararlarını ortaya koymak ve bunların mekanizmalarını irdelemek açısından önem taşımaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması nöron üzerinden yapılan işlemlerde hücrenin vereceği yanıtların bilinmesine, ayrıca tedavi etkinliği, kalitesi ve uygulanabilirliğinin artırılmasına neden olacaktır.

II- GENEL BİLGİLER

a- RF UYGULAMALARININ TARİHÇESİ

Çeşitli hastalıkların tedavisinde, dokulara elektrik akımı uygulayarak lezyon oluşturma fikri, ilk kez 1931’de Krischner tarafından trigeminal nevraltide uygulanmıştır (10). Bu uygulamada diatermi makinesi ile 350 mA’lık akım kullanılmıştır ve girişim için skopi kontrolü altında 10 cm iletken uçlu iğne Gasser ganglionuna yerleştirilmiştir. Ancak bu uygulamada kullanılan direkt akımın istenilen lezyon kontrolünü sağlayamaması ve ağrılı olması nedeniyle bu yönde girişimler fazla yaygınlaşmamıştır. Hunsperger ve Wyss ise 1953’te bu tip uygulamalarda direkt akım yerine, yüksek frekanstaki (300-500 kHz) elektrik akımı kullanımını önermişlerdir. Bu frekanstaki akımların radyo transmitterlerinde de kullanılmasından dolayı “radyofrekans akımı” terimi bu akımların tanımı olarak kabul görmüştür (11). RF akımı kullanılarak ağrı tedavisi, 1965 yılında Rosomoff ve ark.’ları tarafından tanımlanmasından bu yana kullanılmaktadır. İlk RF uygulamaları; 1965 yılında Rosomoff (1) tarafından uygulanan perkütan kordotomi ve 1974 yılında Sweet and Wepsic (12) tarafından uygulanan trigeminal ganglion rizotomi olsa da, Uematsu (13), 1977 yılında, dorsal kök gangliyonunda (DRG) lezyonlama tekniğinin kullanımını tanımlamıştır. 1970’li yılların sonuna doğru iğnelerin kalınlığı v.s. gibi teknik yetersizlikler nedeniyle oluşan komplikasyonların artması nedeni ile RF uygulaması kullanım sıklığında büyük bir azalma olmuştur. 1980 yılında Sluijter ve Mehta (14) tarafından geliştirilen ve yöntemin güvenliğini artıran küçük çaplı, 22 G kalınlığında bir kanül ve bunun içinden geçen, ucunda dokuda oluşan sıcaklığı ölçen thermocouple probu taşıyan ince bir elektrot sayesinde, RF teknikleri tekrar gündeme gelmiştir. Radyolojik görüntüleme yöntemlerindeki gelişmeler de, RF uygulamalarının gündeme gelişinde etkin olmuştur. KRF uygulamasında, ısı, RF

elektrodunun ucunu (6,15) çevreleyen dokularda üretilmektedir. Doksanların sonuna kadar ısı oluşumunun, klinik sonuçlardan sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Isının tahmini rolünün ele alındığı ilk yayın Slappendel'in çalışmasıdır. Bu çalışmada Slappendel, RF elektrot uç sıcaklıklarının 40 ila 67 °C'lere ulaştığı konvansiyonel RF uygulamalarının, klinik sonuçları arasında bir farkın olmadığı sonucuna ulaşmıştır (16). Daha yakın zamanlarda, Sluijter uç sıcaklığı 42°C olan konvansiyonel RF uygulamasının ağrı dindirmede etkisiz olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç Slappendel'in elde ettiği sonuçlarla uyum göstermemektedir (6). Aynı makalede, Sluijter, elektrot ucunun düşük sıcaklıklarda olduğu RF uygulaması için başka bir yöntem tanımlamıştır. Pulse RF olarak adlandırılan bu yöntemde, RF akımı pulse (atımlı) tarzda uygulanmıştır. Sluijter, PRF'nin etkisinin uygulama sırasında üretilen elektromanyetik alana (EMF) bağlı olduğunu ileri sürmüştür.

b- RF UYGULAMALARI

1-Konvansiyonel RF

Konvansiyonel yöntem ile uygulanan radyofrekans akımında, işlem için özel olarak tasarlanmış aygıtın ürettiği akım bir elektrot sistemi aracılığı ile ilgili dokuya iletilir. İğne şeklindeki elektrot, “aktif uç” olarak adlandırılan en distal kısmı dışında yalıtkan bir madde ile kaplanmıştır. Aktif ucun boyu 2 mm ile 15 mm arasında değişir. Dokuya iletilen akım, hastaya bağlanan plak şeklindeki nötr elektrot aracılığı ile tekrar RF cihazına döner. Hastanın vücuduna giren akım ile vücuttan çıkan akım eşittir, ancak nötr elektrodun yüzey alanı aktif uçtan çok daha geniş olduğundan, nötr elektrot çevresinde oluşan elektriksel aktivite önemsiz boyuttadır. Aktif uçtan çıkan akım ise, uygulama bölgesinde iki önemli olaya neden olur. Bunlar ısı oluşumu ve elektromanyetik alan oluşumudur (17,18).

Aktif uç çevresinde ısı oluşumunun sebebi, dokunun yüksek frekanstaki akıma karşı gösterdiği dirençtir. Oluşan elektromanyetik alanın dokudaki elektrolitlerin yüklü iyonları üzerinde oluşturduğu elektriksel güç, bu iyonlarda hareket ve sürtünme artışına sebep olur (19,6,20). Isı artışı, akım yoğunluğunun en fazla olduğu aktif uç çevresinde en belirgindir. Dokudaki ısınma sonucu elektrot ucu da ısınır (16,17). Dokuda oluşan lezyon aktif ucun proksimalinde distale göre daha geniştir (21,15). Bu nedenle konvansiyonel RF uygulamalarında elektrodun sinir dokusuna paralel olarak yerleştirilmesi önerilmektedir (29).

Teorik olarak, homojen bir dokuda, RF uygulaması sırasında dokuya iletilen ve ısı oluşumuna neden olan enerji (Q) şu şekilde hesaplanır:

$$Q = P \times t$$

Burada P; watt cinsinden, 1 saniyede dokuya iletilen enerji ve t; saniye cinsinden süredir. I'nın amper cinsinden elektrik akımı ve V'nin volt cinsinden voltaj farkı olduğu bir formülde eşitlik şu şekilde yeniden düzenlenebilir.

$$P = I \times V$$

$$Q = I \times V \times t$$

Bir başka eşitlikte ise empedansın [R (Ohm)] rolü izlenmektedir.

$$V = I \times R$$

Sonuç olarak;

$$Q = P \times R \times t \quad \text{veya} \quad Q = V^2 \times t / R \quad \text{eşitlikleri elde edilir.}$$

Bu formüller lezyon boyutunun belirlenmesinde etkili olan ısı oluşumunun; voltaj, akım, empedans ve uygulama süresi ile nasıl etkilendiğini açıklamaktadır. Lezyon boyutunu belirleyen diğer bir faktör ise ısının kaybıdır. Bunu belirleyen ise dokunun ısı iletkenliği ve kan dolaşımı ile ısının uzaklaştırılmasıdır. Ayrıca elektrodun kalınlığı, aktif ucun uzunluğu gibi teknik özelliklerde bu parametreleri etkilemektedir.

Dokuda oluşan lezyonun boyutunu belirlemek, etkileyen faktörlerin çeşitliliği nedeni ile oldukça zordur. Bu nedenle kontrollü lezyon oluşturabilmek için RF uygulamalarında, elektrot ucu sıcaklığı “thermocouple tekniği” olarak adlandırılan özel bir teknikle monitörize edilir. Sıcaklık monitörizasyonu yaparak şu noktalara dikkat edilir:

- Elektrot ucu sıcaklığının, yapılan uygulamanın çeşidine uygun değere erişmesi
- Ani sıcaklık oynamalarının olmaması
- Kaynama noktası olan 100°C üzerindeki sıcaklıklara çıkılmaması

100°C üzerindeki sıcaklıklarda kaynama sonucu gaz oluşumu ve kömürleşme gerçekleşir. Bu durumda doku içinde hava dolu boşluklar oluşur, akım ölçerde okunan değer düşer, voltaj yükselir (22,19).

Konvansiyonel RF uygulamasına bağlı oluşan ısı lezyonunun tanımlanması amacıyla Moringlane ve ark'nın (21) tavşan beyni üzerinde yaptığı morfolojik çalışmada, 3 farklı bölge tanımlanmıştır.

- En iç kısımda yer alan nekroz bölgesi
- Çekirdek bölgeye komşu, dejenere hücre ve sinir liflerinin bulunduğu sirküler bölge
- Normal beyin dokusuna komşu, ödemli ve süngersi görünümde en dış bölge

Lezyonun boyutu üzerine uygulama süresinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda, belli bir kararlı duruma ulaşıldıktan sonra uygulama devam etse bile lezyon boyutunda anlamlı büyümenin olmadığı gösterilmiştir. Cosman ve ark'nın (23), kedilerde arka kök giriş bölgesi (Dorsal Root Entry Zone, DREZ) üzerinde yaptıkları çalışmada, elektrot ucu sıcaklığının 75°C'de sabit tutulduğu durumda, 30 sn sonrasında lezyonun boyutunun sadece %20 arttığı, 60. sn'den sonra ise lezyon boyutunda değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Sluijter ve Van Kleef'in(6) bilgisayar modelleri kullanarak yaptıkları çalışmada, yumuşak dokuda standart lezyon (medial dal lezyonu, arka kök gangliyonu lezyonu, sempatik zincir lezyonları) oluştururken, 60 saniyeden uzun süreli uygulama yapmanın anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

RF uygulamaları ameliyathane ortamında lokal anestezi ve sedasyon uygulanarak radyolojik görüntüleme eşliğinde yapılır. Girişim çeşidine göre seçilen elektrot, ilgili bölgeye perkütan olarak yerleştirildikten ve yeri radyolojik olarak kontrol edildikten sonra 50 Hz (duysal) ve 2 Hz (motor) frekanslardaki uyarılar ile stimlasyon uygulanır. Motor stimlasyon ile motor sinir liflerinden güvenli uzaklıkta bulunulduğu doğrulanır. Ardından uygulamanın tipine göre değişen elektrot ucu sıcaklarında (rneğin arka kök ganglionu lezyonu için 67°C, gasser ganglion lezyonu için 80°C) ve değişen sürelerde (rneğin arka kök ganglionu lezyonunda 60 sn., intervertebral disk lezyonunda 3-6 dakika) akım

uygulanır. Uygulamalar sırasında, devrenin bütünlüğünü ve kısa devre oluşumunu kontrol etmek, elektrodun doğru yerleşiminden emin olmak amacıyla empedans monitörizasyonu da uygulanmaktadır. Ekstradural yapıların empedansı 300 ohm ile 600 ohm arasında değişirken, medulla spinalisin empedansı 1000 ohm'un üzerinde, intervertebral diskin ise 200 ohm'un altındadır.

2. Pulse RF

PRF'nin etki mekanizması günümüzde kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Şu anda, çoğu çalışma, nöromodülatör-tipi bir etkide, sinaptik iletimde bir değişiklik olduğuna işaret etmektedir (24,25). Elektrot etrafındaki fiziksel olaylar göz önüne alındığında, PRF sırasında belli bir düzeyde destrüksiyon (yıkım) meydana gelse bile, PRF kayda değer bir güvenlik marjı gösterdiği için, klinik öneminin derecesi şüphelidir. PRF sırasında dokularda, termal etkiler veya yüksek yoğunluklu elektrik alanlar nedeniyle, ya da her ikisinin bir sonucu olarak biyolojik değişiklikler meydana gelebilir. PRF uygulamasında, nöral dokuya RF jeneratöründen kısa pulslar halinde RF sinyalleri gönderilmektedir. Bu pulslar sırasındaki ısı üretimi, güç birikimine (power depozisyonuna) bağlıdır. 420 kHz'deki RF frekansında, power depozisyonu, P aşağıdaki gibidir:

$$P = 0.5(j)^2 / \sigma$$

Başka bir deyişle:

$$\text{Güç birikimi } \alpha = \text{Uygulanan gerilim}^2 \times \text{Maruziyet süresi} / \text{Doku direnci}$$

Ticari olarak mevcut olan RF jeneratörleri, 5 ila 50 ms arasında değişen pulse süreleri ve 1 ila 10 Hz arasında değişen pulse frekansı olan PRF sinyalleri sağlamaktadır,

ancak en yaygın olarak kullanılanlar, 2 Hz'lik pulse frekansı ve 20 ms'lik pulse genişliği üretmektedir (18). Her pulse içindeki intrinsek radyofrekans salınım frekansı hala yaklaşık 420 kHz civarındadır ki bu KRF'deki ile aynıdır. PRF'de, pulse süresinin, pulse'lar arasındaki sürenin sadece küçük bir kısmı olması nedeniyle, aynı KRF gerilimindeki ortalama doku sıcaklığı artışı KRF'ye göre PRF'de çok daha azdır. Örneğin, 2 Hz×20 ms'lik bir sekans kullanıldığında, güç birikimi, aynı gerilimdeki sürekli RF sırasındaki güç birikiminin 4/100'üdür. Bu nedenle, PRF'de, elektrot çevresindeki ortalama doku sıcaklığını 45°C üstündeki denatürasyon aralığına yükseltmeden, RF'de yaygın olarak kullanılanlardan daha yüksek voltajlar kullanılabilir. PRF'nin başlangıçta termal etkileri artırmadığı düşünülüyordu, ancak in vitro deneylerde, doku empedansına bağlı olarak, iğne ucunun etrafında 45°C–50°C'ye kadar olabilen, küçük sıcaklık artışları- "ısı spaykları" oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu gibi spaykların büyüklüğünün, pulse genişliğindeki bir düşüşle, örneğin 20ms'den 10ms'ye, azaldığı gösterilmiştir (26). Ancak, bu geçici "ısı spayklarının" ablatif bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir.

Termal etkilerin boyutu ile ilgili belirsizliklere rağmen, yüksek yoğunluklu elektrik alanlarının etkileri iyi tanımlanmıştır. Genel olarak, PRF, KRF'den çok daha güçlü elektrik alanları üretebilmektedir. Elektrot ucunun hemen önünde, uygulanan 45 V'luk bir gerilimde, elektrik alan 185,000 V/m'dir. Ancak, uçtan uzaklaştıkça elektrik alan hızla azaldığı için, destrüksiyon miktarı da çok düşüktür. Aslında, uçtan sadece 0.5 mm uzaklıkta, elektrik alan kuvveti, ilk büyüklüğünün sadece küçük bir oranına katlanarak (26,9). Böylece hedef dokuların çoğunluğu, düşük veya orta şiddetteki elektrik alanlara maruz kalmaktadır, bu da gerçekte, PRF'nin etki mekanizmasında önemli bir rol oynayabilir. Elektrik alanların, indükledikleri transmembran potansiyelleri (U_m) nedeniyle, hücreler üzerinde önemli etkileri olabilir. Bu elektrik alan, Maxwell denklemi ile basitçe ifade edilebilir:

$$E = j/\sigma$$

Burada; E yerleştirilen elektrot çevresindeki elektrik alan vektörünü, j akım yoğunluk İndüklenmiş transmembran potansiyelleri doku bozulması ile sonuçlanabilir. Bu doku bozulması da gerçekte ısı tarafından oluşturulandan daha da spesifik olabilmektedir. Bu etkiler, önemli sıcaklık yükselmeleri olmadan, subselüler ve biyomoleküler düzeyde ortaya çıkar. İyon kanallarında bozulma, dinlenme ve eşik potansiyellerindeki değişiklikler görülebilecek olası etkilerdir. Oluşturulan transmembran potansiyeli, elektrik alan şiddeti ile doğru orantılıdır ve aşağıdaki gibi gösterilebilir:

Transmembran potansiyeli $\alpha = \text{Uygulanan Elektrik Alanının Amplitüdü} \times \text{Hedef sinirin yarıçapı} / \text{İntrinsek RF dalgalarının frekansı}$

Yüksek transmembran potansiyelleri (0.1 ila 1V'lik U_m), deformasyon süreci, por oluşumu ve yeterince yüksek ise hücre zarlarının rüptürünün dahil olduğu süreç olan elektroporasyona neden olabilir (26,27).

PRF'nin etkileri için örnek bir açıklama sunan düşük elektrik alan fenomeni, teorik olarak, kondisyonman stimülasyonunun olası bir sekeli olan uzun dönem depresyona (LTD) neden olabilir(26,28). Bu görüşe göre, PRF'deki düşük frekanslı pulslar ve yüksek voltajlar, spinal kord'da sinaptik iletimde LTD'ye neden olur ve bunu yaparken de, birçok ağrı durumunun altında yattığı iddia edilen uzun dönem potensiyasyonu antagonize ederler (2,29)

c. Konvansiyonel ve PRF Uygulamalarının Karşılaştırılması

KRF'de ısı ile doku hasarı oluşturulurken, PRF tekniği klinik olarak gözlemlendiği kadarıyla nondestrüktif bir uygulamadır. KRF'de yeterli lokal anestezi uygulanmazsa girişim ağrılı olabilir, uygulamayı takip eden dönemde nörit benzeri reaksiyon gözlenebilir ve duysal kayıp ortaya çıkabilir. Uygulama bölgesi kemik komşuluğunda ise ya da doku homojen değil ise lezyon boyutu beklenenden büyük olabilir. Ayrıca elektrodun yanlış bölgeye yerleştirilmesi durumunda istenmeyen hasarlar (ör: ön motor sinir hasarı) meydana gelebilir (6).

PRF nondestrüktif bir yöntem olduğundan, KRF'in uygulanamadığı bazı durumlarda (nöropatik ağrı, C₈'in arka kök ganglionu, motor lifleri olan periferik sinirler) uygulanabilir. Girişim genel olarak ağrı oluşturmaz, girişim sonrasında uygulama bölgesinde rahatsızlık hissedilse de bu KRF'e göre oldukça düşük düzeydedir. PRF nörit benzeri reaksiyon ve duysal kayıp oluşturmaz. Uygulama bölgesinin kemik veya skar dokusu komşuluğunda olması pulse RF'in komplikasyon riskini arttırmaz. PRF tekniği elektrot ucundan uzak bir bölgede etki oluşması istendiğinde uygun değildir. Çünkü ısı çevreye yayıldığı halde elektromanyetik alan yayılmaz (6).

d- Nöron Kültürü

Nöron hücrelerinin kültür ortamında dizin hücreleri olarak yaşatılması, in vivo şartların üç boyutlu ortamından ve karmaşıklığından çıkılarak iki boyutlu ortamda nöron davranışının incelenmesi ve deneysel şartlarda verdikleri tepkilerin irdelenmesi sağlanır. Nörotoksik maddelerin, in vitro test tekniklerinde hücre üzerine etkisi selektif bir şekilde olmaktadır. Bu spesifik duyarlılık bileşiğin ekstrasellüler konsantrasyonuna da bağlıdır. Genellikle ana

bileşige bağlı toksik etki meydana gelmekte ise de, bazı durumlarda metabolitlerin de toksik etkileri görülebilir. Toksik maddenin fizikokimyasal özelliklerinin toksik etkiyi direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Hücre substratum ilişkisi toksik etkide önemlidir. Sinir sisteminde nöronlar ve nöroglial hücreler vardır. Nöronların farkı akson ve dentritlere sahip olması ve bunlar aracılığı ile diğer nöronlar ve nöroglial hücreler ile haberleşmeyi sağlamasıdır. Dentritler nöron yüzeyini artırarak diğer hücrelerden input almayı kolaylaştırır. Nöronal hücre membranının yapısal komponentlerinin korunması için gerekli faktörleri üreterek hücre fonksiyonunu korur. Bunlardan bir tanesi olan myelin, aksonun etrafını sarar. Böylelikle hücre algılama iletişim birleştirme ve saklama işlemlerini yürütür. Hücre toksik bir etkiye maruz kalırsa perikaryonun direkt etkilenmesi veya trofik faktörlerin kaybolmasına bağlı sinapsın bozulması ile yozlaşma başlar. Burada hasarı belirleyen toksisitenin şiddet ve süresi ile kalıcılığıdır. Dejenerasyon süreci oluşan mekanizmaya bağlı olarak hızlı veya yavaş gerçekleşebilir. İn vitro ortamda nöronların temel fonksiyonu olan nörit uzaması, aksonal transport gibi kritik hücresel olaylara bağlıdır. Nörit uzaması, mikrotubil birleştirici protein ve nörofilament proteini gibi nörit için özel yapısal elemanlara bağlı gelişir (30,31). Biyolojik, kimyasal ve çevresel toksik maddeler nörit uzamasını engeller. Nörit geliştiren faktör, nöronotrofik faktör ve glial maturasyon faktörü nörit uzamasının gelişim sürecinde rol oynarlar. Bu nedenlerle nörit uzamasının izlenmesi yeni moleküllerin nörotoksik aktivitelerini araştırmak için kullanılabilir (32).

RF uygulamalarının nöron davranışına olan etkileri araştırmak, uygulamanın olası zararlarını ortaya koymak ve bunların mekanizmalarını irdelemek açısından önem taşımaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması nöron üzerinden yapılan işlemlerde hücrenin vereceği yanıtların bilinmesine ayrıca tedavi etkinliği, kalitesi ve uygulanabilirliğinin

arttırılmasına neden olacaktır. Böylece hasta ve tedavisi için yaşam kalitesinin artması sağlanacaktır.

e- Nörotoksisite

Endojen ve eksojen toksik maddelerin sinir sisteminin normal aktivitesini olumsuz yönde değiştirmesi nörotoksisite olarak adlandırılır. Bu değişiklik bazen sadece fonksiyonel düzeyde kalmaz, morfolojik olarak hücre yapısında değişikliğe kadar gidebilir. Nörotoksik ajan için miktar ve maruz kalma süresi önemlidir. Nörotoksisite araştırmaları ile ilgili yapılmış çalışmalarda, artık güvenilirliği kabul edilmiş invitro nörotoksisite tarama testi sıklıkla kullanılmaktadır . Artemisin invitro nörotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, in vitro nörit ilerletmesi, nörit büyümesi analiz yöntemi ve tetrazolyum tuzlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilen ve MTT testi denilen test ile hücre metabolizması incelenmiştir. MTT testinde, spektrofotometrik olarak incelenmiş ve işaretlenmiş dehidro artemisilin NB2a (nöroblastoma hücre dizini) hücrelerine verdiği zarar araştırılmıştır. Farklı dehidro artemisil deriventlerinin değişik dozlarda kültür ortamına uygulanmasıyla doza bağımlı olarak nörit büyümesinin farklılaşmış NB2a hücrelerinde anlamlı bir şekilde inhibe edildiği ve hücrelerin yine doza bağımlı olarak MTT testinde metabolizmalarının bozulduğu gösterilmiştir. İlginç olarak toksik etki hiçbir fonksiyonel ve davranışsal bozukluk göstermeden de sadece histolojik bulgu şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bir çalışmada her iki test arasında özellikle MTT'ye göre nörit inhibisyonunun çok daha fazla etkilenmiş olduğu, hücre ölümüne nazaran nöronun toksik etkiye verdiği tepki olarak nörit inhibisyonunun daha da fazla olduğu görülmüştür. Burada toksik etkinin mekanizması olarak, oluşan serbest radikallerin oksidatif hasara neden olduğu ve oksidatif hasarın da lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile nöral membranlarda veya hücre iskeletinde

bozukluğa neden olarak hücrenin ölümüne sebebiyet verdiği düşünülmüştür. Nörotoksik etkinin oluşmasında hücre iskelet proteinlerinin etkilenmesi de oldukça önemli olmaktadır. Çünkü bu proteinler sayesinde akson bütünlüğünü koruyabilmekte daha da önemlisi uzayabilmesi için gerekli şartları sağlayabilmektedir. Bir başka çalışmada endojen glutatyon partiküllerinin antioksidan ilaca bağlı nörotoksik etkinin engellenmesinde önemli rol oynadığı ve enzimatik antioksidanlardan SOD (Süperoksit Dismutaz) ve katalazın, nonenzimatik antioksidanlardan da glutatyon, L-sistein, N-asetil sistein ve askorbik asidin oluşan nörotoksisiteyi gerçekten engellediği ve süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksidin ve hidroksilli radikallerin toksisite sırasında oluştuğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin nörotoksisiteyi engellemesi, aslında toksik etkinin veya nörotoksisitenin hem hücre içersinde hem de dışarıda olduğunu göstermektedir (33-35).

Başka bir çalışmada genel toksisitenin ölçülmesinde Loenin modifiye versiyonu ile yapılmış total protein konsantrasyonları ölçülmüş ve total protein konsantrasyonlarının azalmasına bağlı olarak toksik etkinin varlığı saptanmıştır. Bu çalışmadan da anlaşılacağı gibi nörotoksisite tarama testi şeklinde adlandırılan ve nörit inhibisyonuna dayalı testin, nörotoksik etkilerin ölçülmesinde ve duyarlılığının arttırılmasında önemli bir test olarak yer alacağı düşünülmektedir. Bir başka çalışmada tetrahidropiridinin (MPTP) fare nöroblastoma hücrelerinde toksik etkisi araştırılmıştır. MPTP'nin substansiya nigrada dopaminerjik nöronlarda dejenerasyona neden olduğu ve insanlarda parkinsonizm benzeri bir durum oluşturduğu bilinmektedir. Bu nörotoksik etkinin aktif metabolit ürettiği ve komşu gliyal hücrelerde katekolaminerjik enzim monoaminooksidazı kullandığı bilinmektedir. Bu oksidasyon sonucunda oluşan metabolite bağlı toksisitenin mitokondriyal oksidatif sürecin inhibisyonu ile veya toksik reaktif oksijen ürünlerinin oluşturulmasıyla veya intrasellüler Ca^{+2} seviyesinin azaltılmasıyla ve aynı zamanda glutamatla üretilen

eksitotoksisitenin indüklenmesiyle ilgili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada nörotoksik etkinin kültür ortamındaki dizin hücrelerinde özellikle iskelet proteinlerini etkileyerek toksik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan nörotoksik etki nöritin uzamasının ve çapının azalmasında önemli olabilmektedir. Akson uzadıkça nöroflament seviyesinin değişmesi ile ilgili posttranslasyonel nöritin uzamasına önemli katkı sağlamaktadır. Bu aşamada posttranslasyonel fosforilasyonun gerçekleşmesi aksonun stabilizasyonu için oldukça önemli olmakta ve fosforilasyonun bozulmasına bağlı birçok nöropatoloji ortaya çıkmaktadır. Hücre metabolizmasının değerlendirilmesinde MTT testi kullanılmasına karşın, tripan mavisi veya tripilyum ayolat gibi yöntemlerle de hücre ölümü veya membranının bozulması ortaya konabilmektedir. Nöroflament fosforilasyonunun nörotoksik etkinin gösterilmesinde erken bir kriter olarak ortaya çıkması bu protein fosforilasyonuna bağlı ile stresle aktiflenmiş protein kinaz sinyal mekanizmasının önemini ortaya koymaktadır. Yapılan bu çalışmada, örneğin alüminyuma bağlı nörotoksik etkide, nöroflament proteininin translokasyonunun ve iletisinin bozulduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada apopitozisin mekanizmasından bahsedilmektedir. Genel olarak morfolojik ve biyokimyasal olarak iki ayrı yol hücre ölümünde gösterilmiştir. Bunlardan biri nekrozis, diğeri de apopitozistir. Amiloide bağlı nörotoksik etkinin araştırıldığı bu çalışmada değişik hücrelerin amiloid toksik antına verdiği tepkiler incelenmiştir. Bu çalışma göstermektedir ki; artmış intrasellüler Ca^{+2} miktarı apopitozise direkt olarak sebebiyet vermekte ve her ne kadar nekrozisin oluşmasında kendisi önemli bir faktör olsa da, apopitozisin erken oluşmasında da rol oynamaktadır. Bu çalışmada, insan ve hayvanlarda nörotoksik etkinin kompleksliğinin, değişik kimyasalların ve onların metabolitlerinin birbirleriyle olan etkileşiminden kaynaklandığı belirtilmiştir. Özellikle organofosfatlara bağlı toksik etkinin nöronal asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonuyla olduğu gösterilmiştir. Hatta bu

gecikmiş nöropati şeklinde de karşımıza çıkabilmektedir. Toksik etkinin sadece hücrede olmayıp, aynı zamanda protein sentezi başlatılarak bir başka mekanizmanın da ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bir çalışmada nörotoksik etkinin varlığı eksitator aminoasitlerle ve serbest radikal üreten nörotoksik ilaçlarla ortaya konmuş ve nörotoksik nörit inhibisyonunun yanı sıra, hücre proliferasyonunun durması, protein sentezinin engellenmesi ve hücre ölümüyle gösterilmiştir. Bu çalışmalarla, kültürdeki nöroblastoma hücrelerinde güvenliliği ve kullanılabilirliği kanıtlanmış in vitro nörotoksisite tarama testi, diğer kullanım alanlarının yanı sıra klinikte kullanılmakta olan ilaçların nörotoksik potansiyellerinin saptanmasında da yararlı olmaktadır (33-35).

Bu araştırmanın amacı RF uygulamalarında kullanılan klasik RF ve PRF tekniklerinin kültür ortamına alınmış nöral dizin hücrelerinde hücre ölümü ile hücrenin toksik etkiye ılımlı bir cevabı olan nörit uzatmasının inhibisyonu arasındaki hasar mekanizmalarının apoptosis ile oksidatif stres yönünden etkilerinin araştırılmasıdır.

f- Oksidatif stres

Nitrik oksit'in keşfedilmesinde Furchgott ve Zawadski tarafından ilk kez 1980'de endotel kökenli vazodilatasyon etkili bir madde (Endothelial Derived Relaxing Faktor, EDRF) tanımlanmıştır. NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 1992'de NO yılın molekülü olarak tanımlanmıştır. Bugün artık endotel kaynaklı nitrik oksidin hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konmuştur. Yine bugün birçok hücrede NO sentezlendiğini ve vasküler tonusun düzenlenmesinin yanı sıra bir mediatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel

adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bilinmektedir (36).

Nitrik oksit renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldir (Şeki1. 12). Yarı ömrü 2–10 saniyedir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilerek nitrat ve nitrite dönüşür. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır (37). Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu nitrik oksite çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir (38). NOS başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (39). Yapısal NOS (cNOS, NOS1, NOS3) hücre içinde sürekli var olan ve vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonunda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda (nNOS), vasküler endotel hücrelerinde (eNOS), endokard, myokard ve trombositlerde bulunur. Ca^{+2} /kalmodülin bağımlı bir enzim olan cNOS çeşitli uyanlarla geçici olarak intrasellüler iyonize Ca^{+2} konsantrasyonunun (10^{-7} mol/L) fizyolojik sınırlar içinde yükselmesi sonucu aktive olur ve esansiyel miktarda NO sentezlenmesine yol açar. Endotel kaynaklı eNOS (NOS- 3) arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenozin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. Dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde görev alır. nNOS; beyin, cerebellum, nöroblastlarda bulunur ve nörotransmitter olarak görev yapar (40). Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS- 2) fonksiyonel olarak Ca^{+2} bağımsız olması nedeniyle cNOS'dan farklıdır. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle

uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir ve hücrede nanomol gibi büyük miktarda NO sentezi yapabilir. Makrofajların aktivasyonu ile sentezlenen NO'nun başlıca makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf nüveli lökositlerde tespit edilmiştir. Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü yeterince bilinmemektedir. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda önemli olabilir. Sitotoksik rol oynarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemlidir (41).

g-Serbest radikaller ve Apoptosis

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin kimyasal bağ yapmasıyla meydana gelir. Bu bağ negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır. Elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftleşmiş durumdadır. Eğer elektron çiftleşmemiş ise molekül daha reaktif duruma gelir ve kararsızlaşır. Bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere "Serbest Radikaller" denir . Serbest radikallerdeki çiftleşmemiş elektronlar kararlı duruma geçme eğiliminde oldukları için, kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Bu olay, bir zincir reaksiyon olarak ya da bir başka molekül üzerinde bulunan çiftleşmemiş elektronla, serbest radikal üzerindeki çiftleşmemiş elektron birleşene kadar ya da zincir reaksiyonu, antioksidanlar tarafından kırılana kadar devam eder . Organizmada serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile oluşabilmektedir. Bütün serbest radikaller oksijenden köken almaz fakat çoğunluğu öyledir. Oksijen içeren reaktif moleküller, ki pek çoğu serbest radikal durumundadır, biyolojik sistemler için çok

önemlidir. Bununla beraber, organizmadaki oksijenin küçük bir yüzdesi (%5 kadar) serbest radikallere çevrilir, bunların bir bölümü çok toksiktir. İlginç olarak, O₂'nin kendisi bir radikaldir fakat toksisitesi düşüktür. Çünkü O₂ iki çiftleşmemiş elektrona sahip olmasına rağmen, onlar aynı (zıt değil) dönme yönüne sahip olduklarından dolayı molekülün oksidasyon potansiyeli düşüktür fakat yok sayılmaz. ROM oksijen merkezli serbest radikallerdir veya serbest radikallerin indirgenme ürünleridir. ROM (süperoksit anyon O₂⁻, OH⁻, H₂O₂) normal metabolizma süresince üretilmektedir. Ancak, iyonize radyasyon, oksitleyici özellik taşıyan ajanlar (bazı ilaçlar, örn; antineoplastikler, bazı antibiyotikler), hücreye yabancı olan maddeler (ksenobiyotikler), hiperoksi, enflamasyon, hava kirliliği, kanser, diyabet ve yaşlanma gibi durumlarda ROM üretimi artabilir ve hücre hasarına neden olabilir. Hasar, temel olarak hücrelerin ve değişik organellerinin (lizozom, mitokondri, endoplazmik retikulum vs.) fosfolipit membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu tarafından oluşturulur. ROM, lizozom membranı üzerinde direkt etki gösterir ve hücre yapısını bozucu proteolitik enzimlerden oluşan içeriklerin hücre sitoplazma içine salınmasına neden olurlar. O₂'ye enerji ilavesi, tekli (singlet) oksijen (1O₂) molekülünü meydana getirir. Süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ise O₂'ye tek bir elektronun ilavesi sonucu oluşur. O₂⁻ radikali, SOD enzimi tarafından katalitik olarak H₂O₂ indirgenir. H₂O₂ düşük toksisiteye sahiptir fakat kolayca hücre membranlarına penetre olabilir. Özellikle geçiş-metal iyonlarının (demir, bakır) varlığında O₂⁻ ve H₂O₂ yüksek derecede reaktif OH⁻ oluşumu ile ilgilidir. Bu reaksiyon "Fenton Reaksiyonu" olarak bilinir. $e^- + 2H^+ + O_2 \rightarrow H_2O_2$. SOD $Fe^{2+}/Cu + O_2 \rightarrow OH^- + H_2O_2$ ve H₂O₂ DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'ya saldıran serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar. Bu zararlar, karsinojenik olan mutasyonlara neden olabilir.

Serbest radikaller, ayrıca proteinler üzerinde de zararlı etkiler bırakırlar. Proteinin aminoasiti üzerindeki aktif bölgenin kapanmasına, sülfidril gruplarının kaybına ve karboksil gruplarının oluşmasına neden olurlar. Bu zararlar sonucunda, özellikle sülfür içeren enzimlerin ve diğer protein yapıları enzimlerin aktiviteleri kaybolur. Karbonhidratlar üzerindeki etkileri ise, prostoglandin oluşumu gibi hücrese reseptör fonksiyonlarını değistirmek seklindedir . DNA ve enzimlerden baska serbest radikallerin en önemli zararları, membran çoklu doymamıs yağ asitleri üzerinedir. Radikal saldırı, öncelikle konjuge sistemdeki karbon merkezli radikal oluşumu ile baslar (L). Bu asama başlangıç basamağıdır. Bu radikalın moleküler oksijene saldırmasıyla ilerleme basamağı baslar ve çoklu doymamıs yağ asidi radikali oluşur (LOO). Bu oluşan peroksil radikali ortamda bir sonlandırıcı yoksa bir baska çoklu doymamıs yağ asidine saldırarak tekrar radikal oluşturur. Bu şekilde lipit peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu seklinde sürer. Ancak, iki çoklu doymamıs yağ asidi radikali bir araya geldiğinde reaksiyonun sonlanma basamağı gerçekleşir ve radikal olmayan bir ürün oluşur .

Apoptoz, reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranını hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Fisher ve arkadaşları, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) uygulanması ile spermatozoada ROS seviyelerinde artış gözlendiğini, bunun da mitokondriyal membran potansiyelindeki kayba aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir. Moleküler seviyede, ROS, DNA'yı direk etkiler ve apoptozu indüklemenin en etkili yöntemlerinden biri olduğu bilinen intrasellüler kalsiyum seviyelerini değiştirir.

Hidrojen peroksidin apoptozu tetiklemede intrasellüler mekanizması tartışma konusudur. Bu molekölün kendisi reaktif olmayan bir yapıya sahiptir; peroksidatif hücrese toksik etkisinden, metal ile katalizlenen Fenton veya Harber-Weiss reaksiyonu sonucu

üretilen oldukça reaktif hidroksil radikalinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, Kasahara ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hidroksil radikalinin etkisizleştirilmesi için dimetil sülfoksit veya bir demir şelatörü kullanılmış ancak etkin bir koruma gözlenmemiştir. Bu da apoptotik yolun peroksidatif hasarla bir bağlantısının olmadığını gösterir. Diğer bir apoptozdan sorumlu olabilecek serbest radikal olan peroksinitrit, nitrik oksit ve süperoksitin etkileşimi ile oluşur ve birkaç hücre serilerinde apoptozu indüklediği görülmüştür. Varikoselli hastalarda, peroksinitrit üretimi için ksantin oksidazın nitrik oksit sentaz ile birlikte çalıştığı düşünülmektedir ve normalde germ hücrelerinde saptanmayan endotelial nitrik oksit sentaz, insan testisinde, dejenere olan veya apoptotik germ hücrelerinde saptanmıştır. Apoptozu yol açan nükleer düzenleyici proteininin (NFkB) aktivasyonu, Fas reseptörünün çapraz bağlanması ve kaspaz aktivasyonu gibi farklı intrasellüler sinyaller, intrasellüler ROS üretimindeki artışla ilişkilidirler. Fas sisteminin, testisteki germ hücre apoptozunda anahtar bir düzenleyici olduğu bilinmektedir.

h- Programlanmış hücre ölümü

Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (42). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış romatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile dokuda sürekli bir denge halindedir (43). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (44, 45).

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (46). Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (47). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (Balakumran A. 1996). Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (47,48). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (49). Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (47,48). Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfolipidlerin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür.

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilirken nekrozis fizyolojik bir ölüm şeklidir. Apoptotik hücrede kromatin nükleus membranı agregasyon gösterir ve kondanse olur ancak nekroziste kromatin paterni normal hücredekine benzerdir. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cecikler “membrane blebs” oluşur. Apoptozis ile ölen bir hücrede hücre membranı intaktır ve enflamasyon gözlenmez; nekrozda ise, enflamasyon, hücresel şişme ve hücre zarının bozulması gözlenir (50). Apoptozis bir hücre

hasarına yanıt olarak meydana gelir oysa nekroz genelde hasar sonucu gelişir. Apoptozis önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (51,52).

Programlı hücre ölümü olgun dokularda intrensek intihar programının aktivasyonu ile hasarlı, infekte ya da değişime uğramış hücreleri ortadan kaldırmak için hem gelişimde hem de homeostazisde önemli bir mekanizmadır. Apoptozisin başlamasına neden olan ve soy hakkında bilgi içeren sinyaller viral yangı sinyali ya da ekstrasellüler sinyallerdir. Ekstrinsik sinyaller apoptozisi başlatır, ya da baskılar, intihar edecek olan hücrelere yardımcı olabilir ve aynı sinyaller bir hücre tipinde kurtulmayı başlatabilir. İntihar programının aktivasyonu spesifik mRNA molekülerinin sentezini translasyonunu gerektirir. Programlı hücre ölümü bazen hücre ölümünü intrensek mekanizmalar yoluyla transkripsiyon ya da translasyonu, kısıtlama ile de baskılayabilir (53). Bir hücrede apoptozis mekanizması iki yolla düzenlenir: Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis. Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptozis (54). Hücre yüzeyi ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) süperailisine ait transmembran proteinlerinin bir familyasıdır. Bu reseptörler hücre dışındaki bölgelerde tekrar eden sistein zengin bölgelerde yer alırlar. Ölüm reseptörleri sitoplâzmanın iç kısmında ‘ölüm bölgesi’ (death domain) denen protein zincirleri taşırlar. Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyarırlar ve hücre dışından gelen uyarıyı hücre içine iletirler (55).

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu ile sitokrom c'nin mitokondriden

sitoplazmaya saliverilmesi sonucu apopitotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör Bcl- 2 ailesidir. Hem pro-apopitotik hem de anti-apopitotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplâzmaya saliverilmesi gerçekleşir veya sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi baskılanır. Apoptozis indükleyici faktörün mitokondriden çekirdeğe geçmesi apoptozis başladığında ve AIF'nin salınımindaki artışı, , mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması, periferal kromatin kondenzasyonu ve plazma membranında fosfolipidlerin ortaya çıkmasına neden olur (56). Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu gerçekleşir. DNA hasarına cevaben de PARP (poly ADP-ribose polymerase- 1) aktive olur. Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır (57). Kaspaz aktivasyonundan bağımsız olan EndoG aktivasyonu, nükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olabilir (58). EndoG'nin salınımı, kaspaz aktivasyonuna paralel olarak apopitotik programı başlatabilir. Bax ve Bak, BH3-only proteinlerin mitokondriye hareket etmeleri ve sitokrom c salınıminin düzenlenmesi için gereklidir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu pro-apopitotik ve anti-apopitotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl- 2/Bax oranınının bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir.

Bid proteini yaşayan hücrelerde sadece sitoplâzmada bulunur. Aktivasyonları sitokrom c'nin sitoplazmaya salınıminin sağlar (59). Bad proteini: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın apopitotik veya yaşam sinyal yolağındaki etkisi proteinin fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir (60). Bim ve Bmf proteinleri Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte

bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve Bmf, apoptozisin tetiklenmesi sırasında mitokondriye göç eder ve Bcl- 2 ailesi ile etkileşime girerler (61).

Sitokrom c: Sitokrom c, apoptozis sırasında mitokondriden salındığında kaspaz aktivasyonunu başlatan, mitokondrial elektron zincirinin bir bileşenidir (59). Mitokondriyal yolla tetiklenen apoptotik yolun erken fazında mitokondrial membran potansiyelinin bozulması ve ardından sitokrom c'nin salınması genel olarak önemli rol oynar (62). Sitokrom c normalde iç mitokondri zarına anyonik fosfolipid 'kardiolipin' ile birlikte bağlıdır. Kardiolipin mitokondriye özeldir, iç mitokondri zarında predominant olarak bulunur. Kardiolipin ile sitokrom c'nin ayrılması ve sitozole salınması apoptozisin başlaması için ilk adımdır. Mitokondrial elektron transport zinciri ile reaktif oksijen radikallerinin ortaya çıkması; sitokrom c'nin harekete geçmesi ve kardiolipinden ayrılması ile sonuçlanır (63).

Apoptozis Başlatıcı Faktör (AIF): Mitokondrinin iç membranında bulunan AIF 57 kD ağırlığında bir flavoprotein olup apoptozis başlangıcında mitokondriden çekirdeğe geçerek kromatin kondenzasyonu yoluyla DNA fragmentasyonunu sağlar. AIF oksidoredüktaz aktivitesi gösterir (64). Bu etkiler kaspazlardan ve AIF'nin oksidoredüktaz aktivitesinden bağımsızdır AIF'nin çok fazla salınımı sonucunda, periferal kromatin kondenzasyonu, mitokondrial transmembran potansiyelinin kaybolması ve plazma zarında fosfolipidlerin ortaya çıkması (65) ile yüksek moleküler ağırlıklı (50 kbp) DNA fragmentasyonu meydana gelir (57).

p53 tümör baskılayıcı bir gen dir ve % 50- 55 insan kanserleri ile ilişkilidir. p53, hücre siklusunun kontrol noktalarında yer alır (66), hücre siklusunun G1 fazında durması ya da hücrede DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse programlı hücre ölümünü

indüklenmesi sırasında aktive olur. Aktive olmuş p53, hücre siklusunun durması, hücre yaşlanma ve birçok tümör oluşumunun engellenmesinde rol oynamaktadır p53 geninin aktive olması p21 (WAF/CIPI- 1), GADD45, MDM2, Bcl- 2, Bax gibi birçok genle ilişkilidir (65). Aynı zamanda p53'ü de negatif feed-back etkisi ile suprese edebilmektedir. GADD45, p21 ile ilişkili olup p53'ün aktive ettiği işlevi tam bilinmemekle birlikte, hücre siklusunu baskıladığı ve apoptozis uyarıcı bir gen olduğu düşünülmektedir. p53 geni, mitozu engelleyip hücre diferansiasyonunu ve DNA onarımını p21 üzerinden yaparken, hücreyi apoptozise Bcl- 2 ekspresyonunu azaltarak, Bax salınımını ise artırarak yani Bcl- 2/Bax oranını değiştirerek yaptığı düşünülür.

Kaspazlar apoptozis mekanizmasında yer alan önemli protein grubudur. Hücre sitoplâzmasında inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Aktif merkezlerindeki sisteinden dolayı sistein proteaz olarak adlandırılan enzim grubudur. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler “effectors” olarak bilinirler. Bu güne kadar tanımlanan 14 kaspaz bulunmaktadır. Bunun haricinde kaspaz ailesi fonksiyonlarına göre iki alt kategoriye ayrılır: 1- Başlatıcı kaspazlar 2- İlerletici kaspazlar. Başlatıcı kaspazlar, 90 aminoasitten fazla aminoasit içeren Kaspaz-gerektiren domain (CARD) bölümü ile ölüm domaini (DD) ve ölüm efektör domaini (DED) içeren N-terminal domain öncülü ile karakterizedir (67). Apoptotik sinyal yolunun erken safhasında etki gösterirler ve apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini ilerletici kaspazlara iletirler (68). Kaspaz İnhibitörlerinden bazılarının önemli olduğu durumlar nöro-dejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi ve otoimmün hastalıklardır. Kaspazlar potansiyel hedefleri oluşturarak bu hastalıkların tedavisinde inhibitör tedavide kullanılabilirler (69). Reseptörler aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna ve apoptozis yol açarlar. Diğer yol mitokondriden

Sitokrom-c sitozol içerisine bırakılır ve kaspaz aktivasyon proteinine (Apaf 1) bağlanır. Ardından Apoptozom olarak adlandırılan multiprotein yapısındaki kaspaz aktive eden kompleksin toplanmasına neden olur.

Apoptozis tanı yöntemleri içerisinde apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz- kontrast mikroskobu ile inceleme yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz Jel elektroforezi, enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi ISEL TUNEL, İn situ hibridizasyon tekniği ve Anneksin-V yöntemi ile apoptozise özgü proteinlerin saptanması ve flow sitometri yöntemi kullanılır (70, 71, 52).

DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: DNA'nın 180- 200 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılması olarak ifade edilen DNA fragmentasyonu programlı hücre ölümünün belirleyici özelliğidir. DNA'nın bu özelliği agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Fakat bu yöntemlerle apoptozisin kesinliği değil DNA'nın fragmentasyonunun anlaşılması için tanımlayıcıdır. Enzimatik yolla DNA fragmentasyonlarının belirlenmesi: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [Tdt]-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) yöntemi 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından doku kesitlerinde ve hücrelerde ilk defa kullanılmıştır. TdT enziminin aktivitesi için DNA'nın 3' ucu biotinlenmiş dUTP ile birleşir. İn situ olarak DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise (ISEL), çoğunlukla Kornberg polimeraz (E. Coli'den elde edilen DNA polimeraz) DNA polimeraz I'in Klenow fragmenti ve TdT kullanılmaktadır. Bu yöntemler, tek ya da çift iplikli DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. DNA fragmentasyonunda DNA iplikleri internükleozomal bölgelerde kırılma olur ve DNA'nın 3'-OH ucu ortaya çıkar. Dana (calf) timus TdT'si ile apoptozisin belirlenmesi, serbest 3'-OH ucuna biotin, dioksijenin-,

floresan veya radioaktif olarak işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması esasına dayanır. Avidin peroksidaz tekniği için 3,3'-diaminobenzidine (DAB) veya 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) gibi kromojenler kullanılarak biotinlenmiş nükleotidler belirlenir. Dioksijenin- işaretli nükleotidler, alkalen fosfataz, biotin ya da peroksidaz işaretli sekonder antikorlar kullanılarak belirlenebilir. Hematoksilen, metilgreen ya da DAPI ile rutin artalan boyaması kullanılarak TUNEL veya ISEL reaksiyonları belirgin hale getirilebilir. Ancak bu iki metodun zayıf tarafları vardır. Bunlardan birincisi apoptozis altındaki hücrelerde internükleozomal DNA fragmentasyonunun ölçülememesi, ikincisi ise DNA fragmentasyonunun apoptozisle mi ilişkili olduğu yoksa DNA'nın rasgele olarak nekrozis ile mi parçalandığı fark edilemeyebilir. O nedenle apoptotik DNA fragmentasyonu biyokimyasal analizler ile desteklenmelidir.

Apoptozun Işık, Elektron Mikroskopik ve Biyokimyasal Özellikleri: Morfolojik olarak birbirinden ayrı iki tip hücre ölümünün varlığının ilk bulguları, Avustralyalı patolojist, John Kerr'den gelmiştir. Sonrasında yapılan EM çalışmalarında, Kerr, bu fenomeni “büzüşme nekrozu” olarak tanımladı. 1972'de Andrew Wyllie ve Alistair R. Currie ile birlikte, British Journal of Cancer' de bir makale yayınlayarak, bu aktif süreci nekrozdan ayırt etmek için “apoptosis” terimini kullandılar. “Apoptosis” terimi, yunan kökenlidir ve yaprak dökülmesi anlamına gelmektedir.

Elektron Mikroskopik Morfolojik Özellikler; Apoptozis, hücreleri, asenkron ve tipik olarak inflamatuvar değişiklik olmaksızın etkiler. En erken gözlenen olay, keskin sınırlı, yoğun, ince granüler hilal şeklinde çekirdek zarına bitişik kütle oluşturmak üzere kromatinin kondensasyonudur. Kondanse kromatinin nükleusa oranı, hücre tipine göre değişir; örneğin lenfoid hücrelerde yüksek, az heterokromatinli hücrelerde düşüktür. Nükleer porlar, kondanse kitlelerin yakınında nadiren gözlenirken, nükleer zarın geri kalan

kısımlarında belirgin bir şekilde gözlenirler. Nükleolar değişiklikler de oluşur, ancak bunlar sadece kesitlerin bazı seviyelerinde görülmektedir . Bu nükleer değişimlerle apoptotik hücreler, komşu hücrelerden ayrılır; desmozomları ayrılır. Hücre yüzey özelleşmeleri (mikrovilluslar gibi) kaybolur. Hücre hacmi azalır, yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller kompakt hale geçer, hücrenin ve nükleus taslağının kıvrımları görünür. Nükleus, çoğu çift membranla sınırlı birçok ayrı fragmana parçalanabilir ve hala kromatin ayrımı yapılabilir. Bunlar, kondanse kromatin içerir ve yüzey kabarıntılarının oluşması (blebbing) esnasında ayrılırlar. Her fragmanda kromatin içeriği ve ebatı değişir; kondanse kromatin tüm enine kesiti kaplayabilir veya periferde hilal şeklinde kalabilir. Nükleer kıvrımlanma ve fragmentasyon, timositler gibi yüksek nükleer/sitoplazma oranına sahip hücrelerde sınırlanır. Bu esnada, sitoplazmada, hücre yüzeyine paralel ışınlar halinde sitoskeletal filamanlar toplanır; ribozomal partiküller semikristalin yapılar şeklinde kümelenir; kaba endoplazmik retikulumlar, konsantrik sarmallar oluşturacak şekilde tekrar düzenlenir; düz endoplazmik retikulumdan gelişen ve plazmalemmanın altında yerleşen sayısız vakuoller, plazma membranı ile birleşip tarayıcı elektron mikroskop (SEM) ile gözlenebilen krater tarzında yapılar oluşur. Bol sitoplazmalı hücreler, geniş yüzey kabarıntıları (bleb) ve çıkıntılar oluştururlar ve en iyi SEM ile demonstre edilebilirler.

İn vivo, apoptotik cisimler, komşu epitel hücrelerince, mononükleer fagositlerce veya tümör hücrelerince oluşuktan hemen sonra fagosite edilirler. İntraepitelyal makrofajlar, kısmen, glanduler epitelde oluşan apoptotik cisimlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar ve sayıları, glandular atrofi ve involüsyonda, mononükleer fagosit göçü ve mitoz ile artar. BALB/c fare timositlerinin, isolog peritoneal makrofajlarla koinkübasyon çalışması, apoptotik hücre yüzey karbonhidratlarındaki değişimleri tanıyan makrofajın, yüzeyindeki, lektin-benzeri moleküllerin varlığını ortaya çıkartmıştır .

Işık Mikroskopik Morfolojik Özellikler; En erken ışık mikroskopik belirti olan ani hücre büzüşmesi, nükleer değişimlere bağlı simultane oluşur. Bu arada, kültüre hücrelerde komşu hücreler arası bağlantı kaybı da bunun delilidir. Büzüşme, muhtemelen, sodyum (Na^+)-potasyum (K^+)- klorür (Cl^-) kotransporter sistemin inhibisyonundan dolayı net bir dışı sıvı akışından oluşur . Histolojik olarak, apoptotik cisimler, bazofilik nükleer materyalli veya materyalsiz, yuvarlak, oval sitoplazmik kitleler halinde görünürler. Çoğu apoptotik cisimler eozinofilik olsa da, pankreatik asiner hücreler gibi fazla ribozom içeren hücrelerden türeyenler bazofilik olabilir. Tomurcuklanmanın sınırlandığı hücrelerden oluşan apoptotik cisimler, orijinal hücre boyutundan hafif küçüktürler. Yaygın tomurcuklanmanın mümkün olduğu hücrelerde, ebat olarak apoptotik cisimler epeyce değişiktir, en küçüğü bile en az bir bazofilik nükleer fragman içerdiği takdirde ışık mikroskobu ile görülebilir. Yüksek nükleus/sitoplazma oranlı hücrelerden köken alanlarda, dar bir sitoplazma ile çevrelenen piknotik kromatin kitlesi şeklinde görülür. Diğer apoptotik cisimler ise, daha çok, değişik miktarda daha küçük nükleer fragmanların bulunduğu sitoplazma içerirler. Ultrastrüktürel olarak karakteristik hilal şekilli görülen kromatin kümeleri, $5\mu\text{m}$ 'lik parafin kesitlerde nadiren görünür; bunun yerine kromatin, yoğun bazofilik kitleler olarak görülür. Kesitlerde, apoptotik cisimler, sıkça belirgin açık boşluklarda yer alırlar. Bunların bir kısmı, soluk boyalı makrofajlardaki cisimleri gösterir; diğerleri ekstrasellüler, doku hazırlanması esnasında büzüşme artefaktı sonucunda oluşan boşluk olabilir. Daha büyük, normal ve patolojik durumlarda uzun süredir bilinen ayrı apoptotik cisimler, farklı isimler alabilir. Bunlar, karaciğerdeki Councilman cisimleri, barsak kriptalarındaki karyolitik cisimler, lenf nodlarının germinal merkezindeki makrofajların tingible cisimleri, liken planusta Civatte cisimleri, ultraviyole radyasyon sonrası güneş yanığı hücrelerini kapsar .

Apoptotik cisimler, dokuda, dağınık kümeler halinde olabilir. Bunlar, tek tek hücrelerin fragmentasyonu sonucu oluşabilir veya tek bir fagositte, tipik olarak makrofajda, birkaç hücreden oluşan apoptotik cisimlerin toplanıp oluşturduğu daha büyük agregatlar şeklinde olabilir. Apoptotik cisimlerin sayıları yüksekse, makrofajlarda degradasyon, lipofuskin pigment oluşumuyla sonuçlanır. İlgili çekici şekilde, apoptotik cisimlerin fagositozunda, makrofajlar, inflamatuvar mediatör salınımıyla cevap vermezler. Apoptotik cisimlerin küçük ebatları ve kısa yarı ömürleri, inflamasyonun yokluğu, apoptotik hücreler uzaklaştırıldığında kalan hücrelerin, hücre sıralarını kapatması, apoptozisi, hücre delesyon oranının yüksek olduğu zamanda bile, göreceli olarak histolojik açıdan az göze çarpar hale getirir. Apoptozis oranında küçük artışlar bile epeyce artmış hücre kaybıyla ortaya çıkar. Örneğin; intravenöz bolus anti-CD4 antikoru uygulanması apoptotik indeksi, sıçan lenf nodlarında, %0,06'dan %1,33'e yükseltir, bu da lenf nodundaki toplam hücre sayısını 48 saatte yarıya indirmek için yeterlidir. Rezidüel hücrelerce hücre sıralarının kapatılması, makul bir doku büzüşmesi ve sıkça normal yapının çok az bozulması ile sonuçlanır. Böylece indüklenen atrofinin tamamlanması sırasında, karaciğer ve adrenal bezler, yapısal olarak normal görünümündedir.

Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri; Apoptozis işlemi, enerji gereksinimi olan bir süreçtir. Fizyolojik hücre ölümünü, belli fazlara bölmek uygun olur. En erken faz, apoptotik cevabı başlatan stimulus fazıdır. Bu, yüzey reseptörleri aracılığıyla yayılan bir eksternal sinyal olabilir veya bir ilaç, toksin veya radyasyon etkisiyle hücre içinden orijin alabilir. İkinci faz, sinyalin veya metabolik durumun saptanması ve sinyal iletimini içerir. Sinyal iletim yolları, bu mesajı, hücre ölümü efektör mekanizmasına iletir. Effektör faz ise, hücre ölüm mekanizmasının üçüncü kısmıdır ve pozitif ve negatif regülatörleri ile beraber proteazların aktivasyonunu içerir. Dördüncü faz, hücre kromatininin kondanese olduğu ve

DNA'sının degrade edildiği postmortem fazdır. Hızlı nükleer DNA yarıklanmasına, uzun zamandır apoptozisin en önemli biyokimyasal göstergesi olarak bakıldı. Bu DNA degradasyonu, iki aşamada oluşur. İlki, 200-300 kilobaz çiftlik fragmanlara ve/veya 50 kilobaz çiftlik fragmanlara yarıklanır. Nükleer zarfa doğru kromatin marjinasyonu, muhtemel morfolojik görünümdür. İkincisi, apoptoza giden hücrelerin tamamını olmasa da çoğunu etkileyen, internukleozomal (nükleozomlar arası bağlayıcı bölgelerden) çift iplikli DNA yarıklanmasıdır, böylece oligonukleozomal ebatlı fragmanlar oluşur. Apoptotik hücre debrisleri, in vivo hemen fagosite edilirler. Bu yüzden, hücre rüptüre olmadan önce, apoptotik hücrelerin, fagositlerce tanınabilmeleri için plazma membran değişimlerini tamamlamaları gerekir. Gerçekten, plazma membran değişimlerinin, programlanmış hücre ölümünde çok erken oluştukları gösterilmiş. Son çalışmalar, canlı hücrelerde, plazma membranının iç yaprağında lokalize olan fosfotidilserinin kritik bir rol üstlendiği bilinmektedir. Apoptoza giden lenfositlerde, fosfotidilserinin dış yaprağa translokasyonunun, makrofajlar tarafından fagositik tanınmaya aracılık ettiği gösterilmiştir. Martin tarafından yapılan çalışmalarda, sıçangillerde ve birçok insan hücre tipinde, başlangıç stimulusu ne olursa olsun, fosfotidilserin eksternalizasyonu en erken olay olarak saptanmıştır. Önemli olan bir not da, fosfotidilserinin yanısıra diğer yüzey molekülleri de, fagositik tanınma ve apoptotik hücrelerin alınmasında şüphesiz çok önemlidir.

Apoptozise giden hücrelerde oluşan dramatik morfolojik değişikliklerden, sitoskeletal elemanlardaki değişimler ve yaygın sitoplazmik proteinaz aktiviteleri sorumludur. Cotter ve arkadaşları, mikrofilament topluluğunun, hücre fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu için gerekli olduğunu göstermişlerdir. HL-60, Molt-4 veya U937 hücre dizilerinin, aktin polimerizasyonunda etkili cytochalasin B ile ön muamelesi, hücre tomurcuklanma ve apoptotik cisim oluşumunu engellemiş, ama nükleusu veya

nükleer DNA'sının fragmentasyonunu bloke etmemiştir. İn vivo, apoptotik cisimlerin, lizis olmaması ve böylece inflamasyona yol açmadığı gerçeği, apoptotik hücrelerde, iki önemli olayı vurgular; membran integrasyonunun korunması ve ani tanınma ve fagositoz. Sitoplazmik proteinlerle, geniş çapraz bağlar kuran doku transglutaminazının (tTG) aktivasyonu, yüzey kabarıntılarının (bleb) oluşumunda ve intrasellüler içeriğin hücrede tutulmasında anahtar bir rol oynamaktadır. tTG, apoptotik cisimlerde, en yüksek konsantrasyondadır.

Apoptozis Mediyatörleri ve Hücre İçi Metabolik Değişiklikler; Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında genler (c-myc), bazı iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediyatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum (Ca^{++}) girişi olur. Sitoplazmada artan Ca^{++} , inaktif durumdaki Ca^{++} bağımlı proteazları ve nükleazları aktive ederek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoze özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur. Ca^{++} iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye Ca^{++} girişi, apoptozun gerçekleşmesi için esansiyel değildir.

Kaspaz Ailesi ve Apoptozdaki Roller; Kaspazlar (caspase-cysteine aspartate specific proteases), zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve çok az rastlanan bir substrat alanı olan aspartik asitten, sonraki peptid bağımlı kırarlar. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve birbirlerini aktive ederek proteolitik bir

kaskata (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10), başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da , efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan PARP'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1-β dönüştürücü enzimdir (ICE) ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, mitokondri aracılı intrinsik yolla sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi sayesinde prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktive edildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler. Sitokrom C ile birlikte apoptoz indükleyici faktör (AIF) de sitoplazmaya salınır. Bu yolda, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) de görev almaktadır. Sitkrom C, ve Apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive ederler. Aktif kaspaz 9 da kaspaz-3'ü aktive eder. Proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır. Ya da ekstrinsik yolla ölüm aktivatörlerinin (fas ligand-FasL- ve Tümör nekroz faktör-TNF-) hücre yüzeyindeki reseptörlerine [Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)] bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Bu bağlanmalar, ölüm domain proteinleri aracılığıyla olur. Kaspaz 8 de diğer kaspazları uyarak hücrenin fagositozuna yol açar . Son mekanizma ise endoplazmik retikulum aracılı apoptozdur. Kaspaz-12, endoplazmik retikulum membranında lokalizedir. Hücre içi Ca⁺⁺ seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin etkisiyle prokaspaz 12 aktifleşir ve sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Terminal uç olan aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece, ICAD'ın bağladığı kaspazla-

aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan, kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma, kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis, yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan apoptozun inhibitörleri (IAPs), kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. IAP'ler tarafından caspase-3, -7, ve -9'un inhibisyonunun yapısal temeli, son zamanlarda rapor edilmiştir. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'ler, ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunuyorsa da bazı üyeleri, örneğin kaspaz 12, Golgi apparatusunda, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondri ile ilişkide bulunabilir. En önemli başlatıcı kaspazlar, tip I apoptoz (mitokondri aracılı, intrinsik) için kaspaz 8, tip II apoptoz (ekstrinsik) için kaspaz 9, tip III apoptoz (endoplazmik retikulum aracılı) için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönmüşsüz noktanın en önemli göstergesidir.

III- GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmaya başlandı.

Hücre Kültürü

NTT (Nörotoksisite Tarama Testi) kullanılarak, fare nöroblastoma, Neuro 2a hücreleri (NB2a) hücre serisine ait nöroblastoma hücreleri kültür ortamında 24 lük weller içerisinde %5 fetal calf serum, %5 horse serum, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu (10000 U/10 mg) ve % 0,1 gentamisin (50 mg/mL) içeren yüksek glukoz konsantrasyonlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile proliferasyon medyumu 37°C ve % 5 CO₂ (karbondioksit) koşullarını sağlayan etüv içinde çoğaltıldı. Proliferasyon medyumu % 5 fetal calf serum + % 5 horse serum + % 0,1 penisilin/streptomisin solüsyonu + gentamisin solüsyonu üzerine yüksek glukozlu DMEM ile 100 mL tamamlanarak elde edildi. Diferansiyasyon (farklılaşma) Medyumu % 0,1 Penisilin/streptomisin solüsyonu + 0.5 mM (milimol) dcAMP (dibütiril siklik adenzin monofosfat) + gentamisin solüsyonu üzerine 100 mL tamamlanacak şekilde yüksek glukozlu DMEM ilavesi ile elde edildi (85, 86, 87).

Kültürde Nörotoksisite Tarama Testi (NTT)

NTT için; 15 000 hücre/mL, 300µL (mikrolitre) olarak ilk üç örneğe, her well için, proliferasyon medyumu (negatif kontrol) ve geri kalan örneklere serum içermeyen DMEM içine dibütiril cAMP (0,5 mM) eklenerek oluşturulan farklılaşma medyumuna (proliferasyon medyumu) konuldu. 24 saat sonra her bir madde konsantrasyonları üç örnek oluşturacak şekilde pozitif kontrol içerisine sadece bidistile su ve diğer örneklere değişik konsantrasyonlarda düşük miktarlarda kimyasal madde ortama ilave edildi. 24 saat sonra

hücreler 10 dakika % 4 formaldehidde fikse edilip 3 dakika Coomassie Blue boyasında (% 0,6) bekletildikten sonra PBS = Posphate buffer solution (Fötal Sığır Serum) ile yıkandı ve ışık mikroskobu altında rastgele seçilen 10 farklı sahadan nörin uzunlukları elle digital ortamda bilgisayar ve Excel programı aracılığı ile ölçüldü. Ölçülen nörin uzunluğu değerleri % inhibisyon ile değerlendirildi. Pozitif kontrol nörin uzunluğundan, toksik madde konulan nörin uzunluğu çıkarılarak, pozitif kontrol ile negatif kontrol farkına bölünerek % inhibisyon saptandı .

MTT (Metil Tiazol Tetrazolyum) Analizi

Yaşayan hücrelerin değerlendirilmesinde hücre serileri; MTT testinde her örneğe ortama 50 µL MTT ilave edildi ve 1 saat daha kültürde bırakıldı. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazona çevrilen MTT'yi çözünür hale getirmek amacıyla 1 mL isopropanol eklendi. 1 gecelik inkübasyonu takiben optik okuyucuda 570 nm (nanometre) dalga boyunda optik dansiteleri okutuldu (91, 92).

İmmünohistokimyasal Analiz

Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında hücre sayımları yapıldı. 24 kuyucuklu kültür kabında çoğaltılan hücreler uygulamalarını takiben paraformaldehit ile tespit edilerek pimer antikor olarak anti-eNOS ve anti-iNOS kullanılarak avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile indirek immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi.

NOS immünohistokimyası: Alınan kesitler immünohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. % 0,5'lik tripsin

solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk % 3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti hidrojen peroksidaz ikincil antikoruna ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Diaminobenzidin tetrahidroklorit) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumuna ile kapatıldı.

TUNEL immünohistokimyası: TUNEL Yöntemi ile apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dk (% 95, % 80, % 70, % 60) rehidratasyon uygulandıktan sonra dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dk (%0.85 NaCl) muamele edildi. 5 dk PBS ile oda ısısında yıkandı. Doku kesitleri % 4 paraformaldehit ile 15 dk oda ısısında fikse edildi; 5 dk PBS ile oda ısısında yıkandı. 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/mL proteinase K 20 dk doku kesitlerine uygulandı. PBS ile yıkamayı takiben % 4'lük paraformaldehit ile 5 dk yeniden fiksasyon yapıldı; 5 dk PBS ile oda ısısında yıkandı. Kesitler 5 - 10 dk Equilibration buffer ile oda ısısında tutuldu. TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dk plastik cover slipler kesitleri kapatacak şekilde konarak tutuldu. 15 dakikalık saline sodium citrate (SSC) yıkamasının ardından 5 dk PBS ile oda ısısında yıkandı. 3 - 5 dk hidrojen peroksit uygulanması sonrası 5 dk PBS ile oda ısısında

yıkandı, 1/500 oranında PBS ile hazırlanan Streptavidin HRP solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübasyona tabi tutuldu; 5 dk PBS ile oda ısısında yıkandı ve ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kere distile su ile yıkama yapıldı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmaya çalışıldı. Negatif kontrol için primer antikor yerine PBS, pozitif kontrol olarak da apoptozis olduğu bilinen testis dokuları kullanıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede preparatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1), ++ (2), +++ (3) olarak körlemesine semi-kantitatif puanlama yapıldı. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Morfometrik İnceleme: Daha önceki çalışmalardan uyarlanan morfometrik yöntem ile akson sayısı, çapı ve miyelin kalınlığı hesaplanarak, bu veriler excel 5.0 grafik-matematik ve Graphpad 1.0 istatistik programları kullanılarak değerlendirildi. $P < 0.001$ oldukça anlamlı ve $P < 0.05$ anlamlı bir fark olarak kabul edildi. Verilerin aritmetik ortalaması, standart sapması Excel 5.0 programında hesaplanıp bu verilere bağlı grafikler Excel 5.0'da çizildi ve istatistiksel değerlendirilmesi Graphpad 1.0 programı ile yapıldı. Verilerin ortalama ve standart sapmaları Excel 5.0'da hesaplanıp, Graphpad 1.0 programı ile tek yönlü varyasyon analizi (ANOVA) uygulanarak gruplar arasında saptanan istatistiksel fark $P < 0.001$, oldukça anlamlı (***) ve $P < 0.05$, anlamlı (*) olarak değerlendirildi.

RF Uygulamaları: 24 adet hücre kültür kabı kullanıldı. Her bir kültür kabının içine steril koşullarda 22 gauge, aktif ucu 5 mm SMK-5 elektrotu (Slujter Mehta, Radionics) yerleştirildi. Radiofrekans aygıtının (RFG 3C Plus, Radionics) nötr ucu yerine monte edilen enjektör iğnesi de kültür kabına yerleştirildi ve devre tamamlandı.

Uygulanan RF süresine göre 4 ayrı grup oluşturuldu.

I. Grup: 180 saniye (12 hücre dizini),

II. Grup: 360 saniye (4 hücre dizini),

III. Grup: 540 saniye (4 hücre dizini) RF uygulandı.

IV. Grup: Kontrol grubu, RF uygulanmadı (4 hücre dizini)

kontrol grubunun ilk 2 hücre dizinine steroid uygulandı.

Tüm gruplar kendi içlerinde 4 alt gruba ayrıldı.

A: 40 °C KRF,

B: 40 °C PRF,

C: 60 °C KRF ve

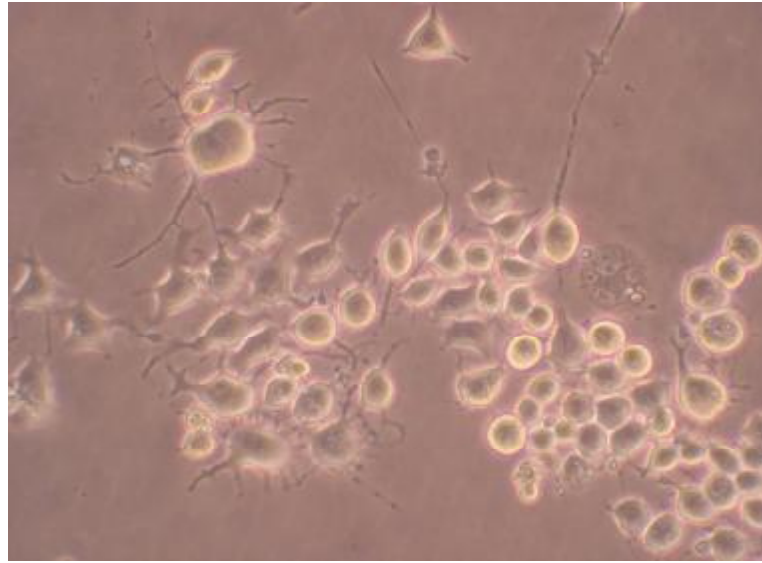
D: 60 °C PRF uygulandı.

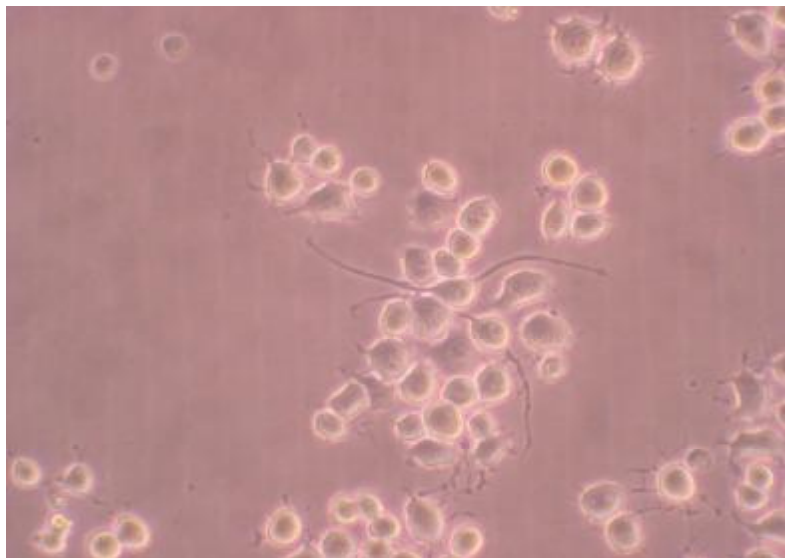
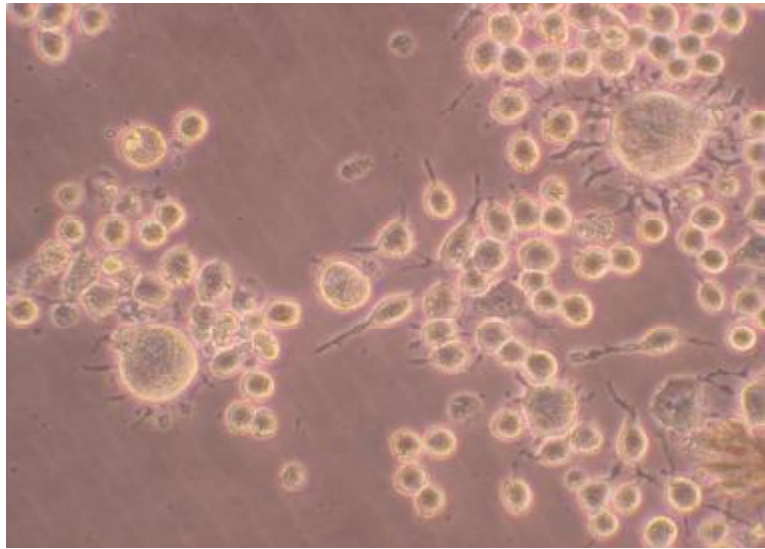
Ayrıca I. Grup ve IV. Grubun (Kontrol) birer hücre dizinine de steroid eklenerek

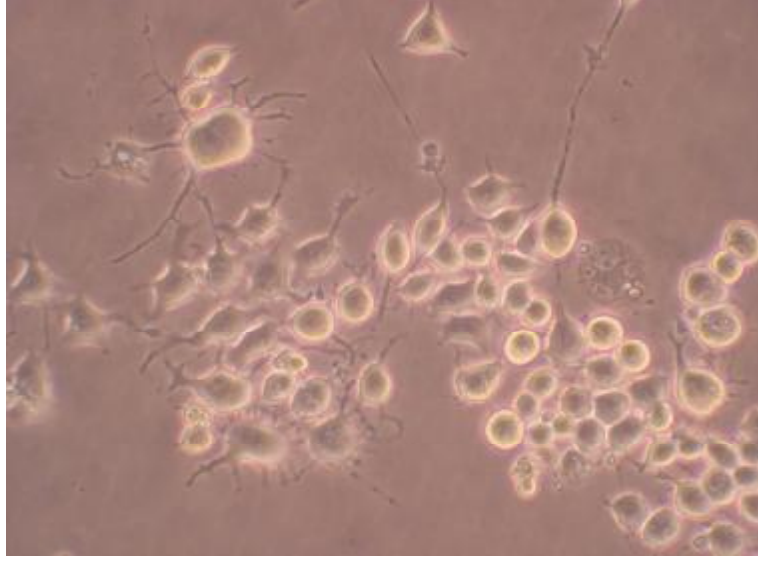
RF uygulamasının yaratacağı muhtemel lezyon üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

IV- BULGULAR

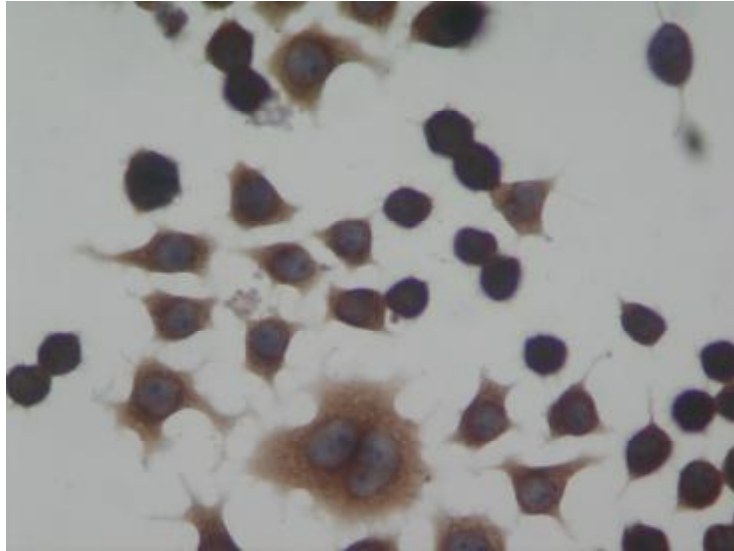
Toksik etkinin daha detaylı incelemesi için hücre kaybını gösteren MTT ve nörit inhibisyonunu ortaya koyan nörotoksite tarama testi yapıldı. Kültür ortamındaki NB2a hücrelerinin farklılaşma etkeni Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP) eklenmeden bölünme ve çoğalma dönemindeki 48 saatlik kültür yaşamındaki görüntüleri alınarak (Şekil III. 1) kültür ortamındaki NB2a hücrelerinin MTT ölçümlerinin kalibrasyonun sağlanması amacı ile katlı konsantrasyonların, yani konan hücre sayısının çoğalarak artmasına bağlı MTT absorbansının arttığı doğrulandı . Hücrelerin 48 saatlik üremelerini takiben yapılan cAMP uygulaması ile nörit uzaması ve nörona farklılaşmanın indüklenmesi sonrasında maksimum nörit uzattıkları görüldü. Hücrelerin nöron olduklarının tanımlanması için Nestin ve Tübülin pozitif olmalarına karşılık Gliari Fibrilin asidik protein (GFAP) negatif olmaları gösterildi (Şekil III. 2). Hücrelerin nörit uzatmalarının tripan mavisi ile yapılan boyamalarında ayrıntıları daha iyi izlendi (Şekil III. 3).



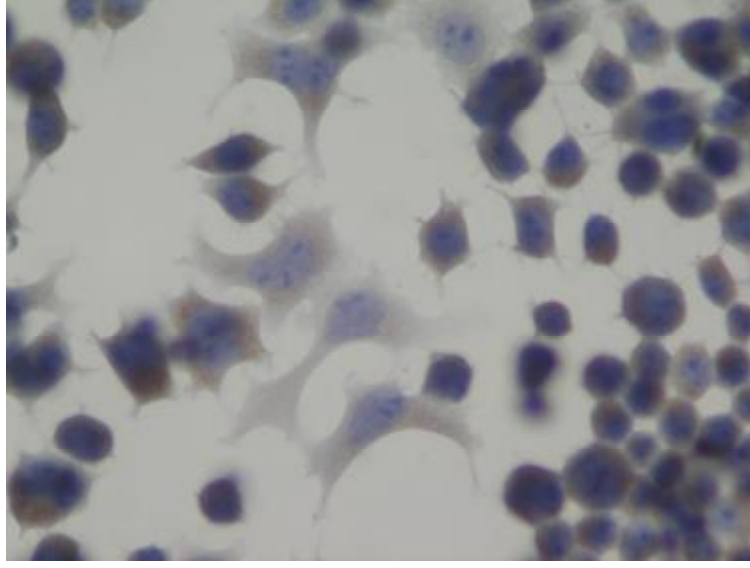




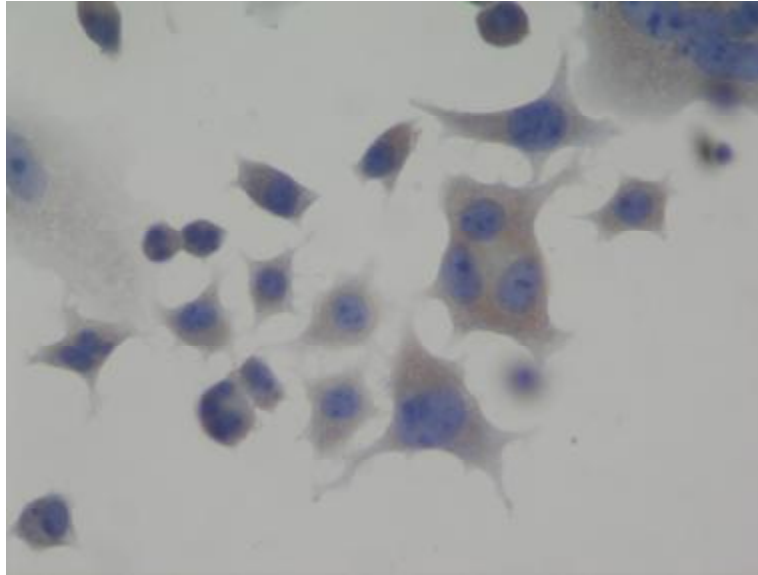
Şekil III.1 Fare nöroblastoma dizini Na2B hücrelerinin nörit uzatmaları ve farklılaşmalarının değişik görüntüleri. cAMP eklenmesi ile çoğalmaları duran hücrelerin maksimum nörit uzatmaları gözlemlendi. Farklı hücre davranışları ve değişik uzunluklarda nörit oluşumları saptandı X20



Na2B B3 TÜBULİN

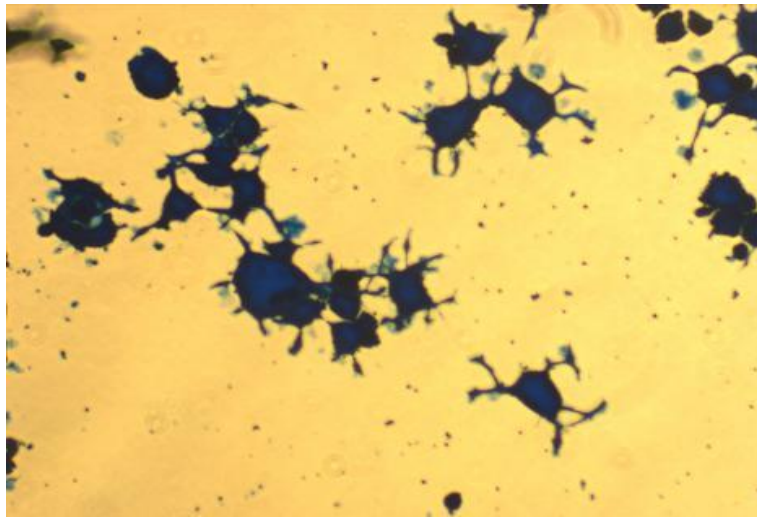
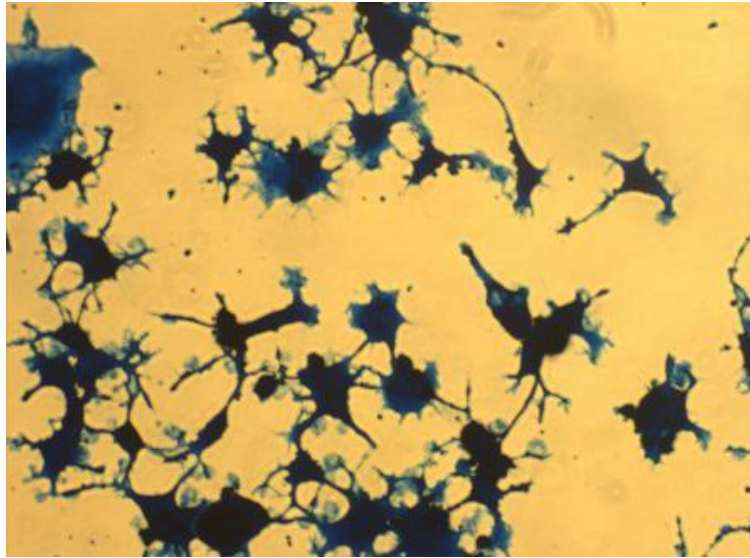


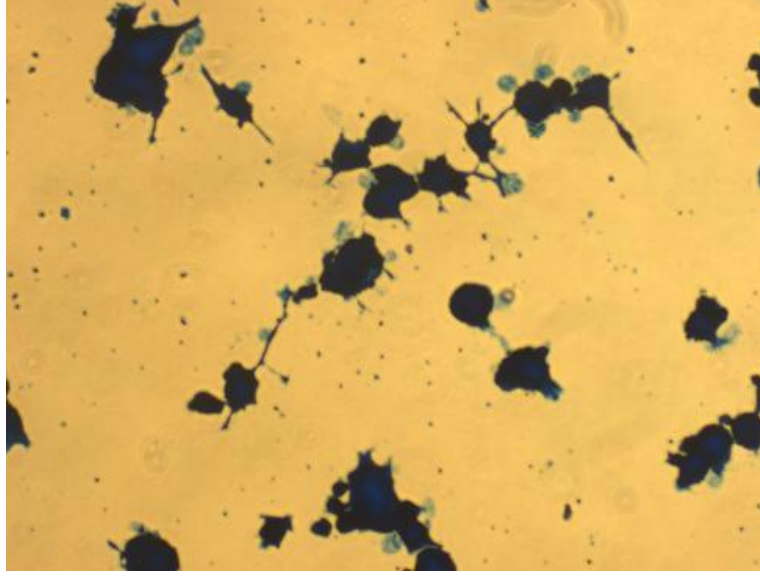
Na2B NESTİN



Na2B GFAP

Şekil III.2 Fare nöroblastoma dizini Na2B hücrelerinin nöron olduklarının tanımlanması için, Nestin ve Tübülin pozitif olmalarına karşılık Gliari Fibrilin asidik protein (GFAP) negatif olmaları gösterildi.





Şekil III.3 Hücrelerin nörit uzatmalarının tripan mavisi ile yapılan boyamalarında ayrıntıları daha iyi görülmektedir.

Uygulamalara başlamadan önce incelenen kültür kaplarında hücrelerin benzer davranış içinde oldukları anlaşıldı.

Hücrelerin çoğalma aşamasında kısa nörit uzantıları gösterdikleri, ancak farklılaşma sürecine girmedikleri için nöron hücresinin genel özelliklerini sahip olmadıkları saptandı. DCAMP eklemesinden sonra farklılaşmaya zorlanan hücrelerin nörit uzatmada belirgin bir ilerleme gösterdikleri ve çoğalma sürecinden çıkarak nöron olmaya döndükleri görüldü .

12 saatlik farklılaşmayı bekleme sürecini takiben yapılan RF uygulamalarında, 540 sn ve 40 °C kullanımı sonucunda belirgin hücre kaybının olduğu gözlemlendi. Hücrelerin adacık yapma formasyonu şeklinde birbirleri ile temas halinde oldukları bölgelerde biraz daha dirençli olmalarına rağmen, kültür kaplarının semikonfluent düzeyin altına indikleri bulundu. Sürenin azaltıldığı 360 sn ve 40°C uygulamalarında yine belirgin hücre ölümünün gerçekleştiği ve bunun KRF ile daha belirgin olduğu anlaşıldı (Şekil III. 8). Sürenin daha da azaltıldığı 180 sn ve 40 °C uygulamalarında hücrelerin yaklaşık kültür kabının üçte biri şeklinde daha az öldüğü, genellikle sağlıklı ve iyi görünümde oldukları görüldü. Bu

görünümün PRF uygulamalarında KRF uygulamalarına göre daha belirgin olduğu saptandı . Aynı sürede ancak daha yüksek dozda yapılan 180 sn ve 60 °C uygulamalarında hücrelerin 360 sn sürelerindeki benzer düzeyde etkilendikleri ve bu etkilenmenin KRF uygulamasında daha belirgin olduğu bulundu.

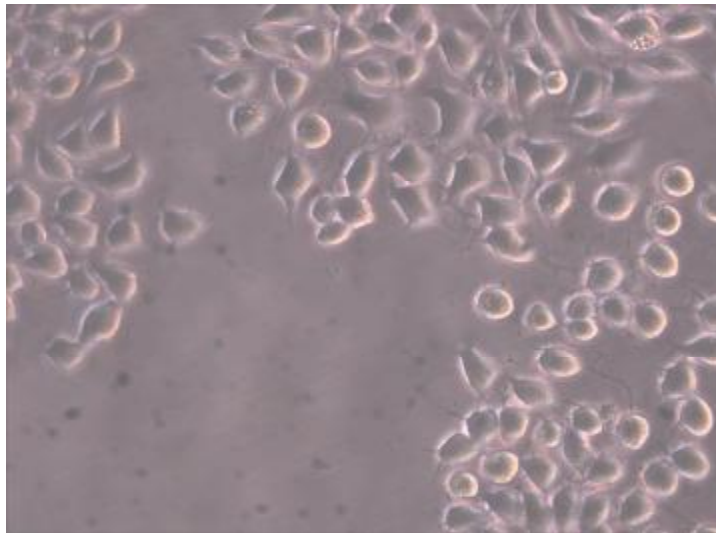
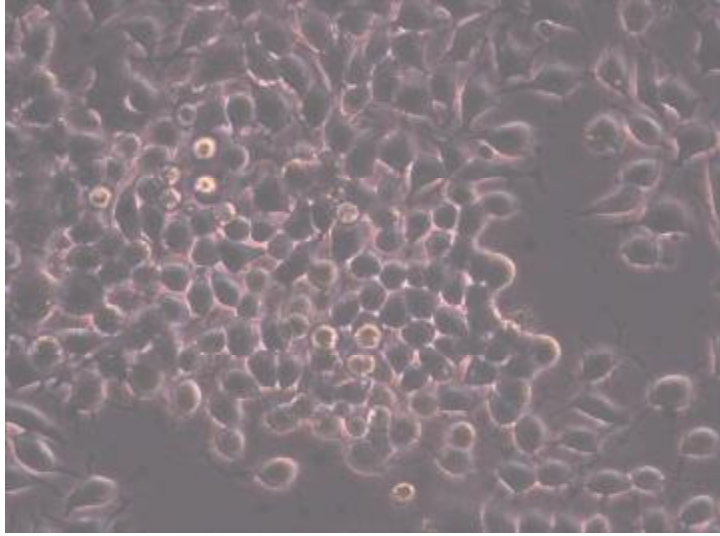
Hücre ölümünün uygulamalar arasında fark oluşturmadığı 180 sn ve 40 °C uygulamalarının büyük büyütmelelerinde RF etkisinin nörit inhibisyonu şeklinde görülen şeklinin daha önem kazandığı saptandı. Nörit uzatma her alanda farklı düzeylerde gerçekleşirken RF uygulamalarının sonrasında oluşan toksik etkinin yine heterojen olduğu ve farklı alanlarda değişik düzeylerde olduğu görüldü (Şekil III. 4).

RF uygulamalarının yaptığı toksik etkinin nörit inhibisyonu şeklinde gerilemesinin ortamda oluşan oksidatif stres ile ilişkisi ve bu ilişkinin getirdiği apoptoz mekanizmasının varlığı için iNOS, eNOS ve TUNEL boyamaları yapıldı. Kontrol örneklerinde bazal düzeyde bir iNOS ve eNOS ortamının bulunduğu ayrıca az miktarda apoptotik hücrenin olduğu anlaşıldı. RF uygulamaları ile belirgin bir biçimde NOS varlığının arttığı ve beraberinde apoptotik hücrelerinde çoğaldığı gözlemlendi. Bu etkinin KRF uygulamasında, PRF uygulaması ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu anlaşıldı (Şekil III. 5).

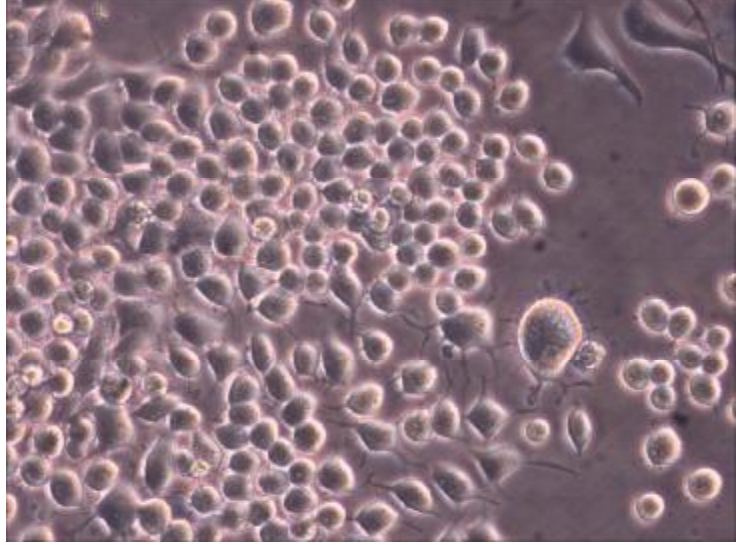
RF uygulamalarının hücre davranışı üzerine etkilerinin mikroskopik incelemelerde gözlenen sonuçlarının morfolometrik analizleri yapılarak genel ve toplam etkinin varlığı incelendi. Hücre sayısında anlamlı olmayan bu azalmaya karşılık ılımlı toksik etkinin bir göstergesi olarak nörit inhibisyonunun incelendiği nörotoksik tarama testinde, hücrelerin kaba yerleştirilmelerinden 24 saat sonra cAMP verilerek hücrelerin nörona farklılaşmalarının sağlanması ve ikinci bir 24 saatlik süre ile serumsuz ortamda oluşturdukları maksimum nörit uzamasına etkisi bulundu. Hücrelerin 48 saatlik kültür yaşamının sonunda fikse edilerek alınan görüntülerde yapılan morfolometrik incelemede uzun sürelerin, oldukça

anlamli ($p<0,001$) bir şekilde hücre ölümüne neden olduğu ancak apoptotik hücredeki artişın aynı anlamlılıkta olmadığı bulundu (Tablo III.1). 180 sn sürenin 40  C doza bağlı hücre ölümünün en az ger ekleştĐi ortam 60 C ve 60 C+steroid uygulamaları ile karşılaştırıldı. 60 C uygulamasının anlamlı ($p<0,05$) bir toksik etki oluşturduğu ancak apoptotik hücre sayısında bir değişiklik oluşturmadığı bulundu. 180 sn ve 40 C uygulamalarında oluşan d şuk düzeydeki toksik etkinin nörit inhibisyonu ile ortaya konması, bu etkinin NOS ve TUNEL ile ilişkisinin morfometrik incelemesinde KRF uygulamasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) nörit inhibisyonu ger ekleştĐi ancak PRF uygulamasında bunun daha az oluştuğu ($p<0,05$) görüldü. Benzer sonuçlar iNOS ve eNOS için bulunurken, TUNEL boyamalarında en az apoptotik etkinin KRF uygulamasında olduğu saptandı .

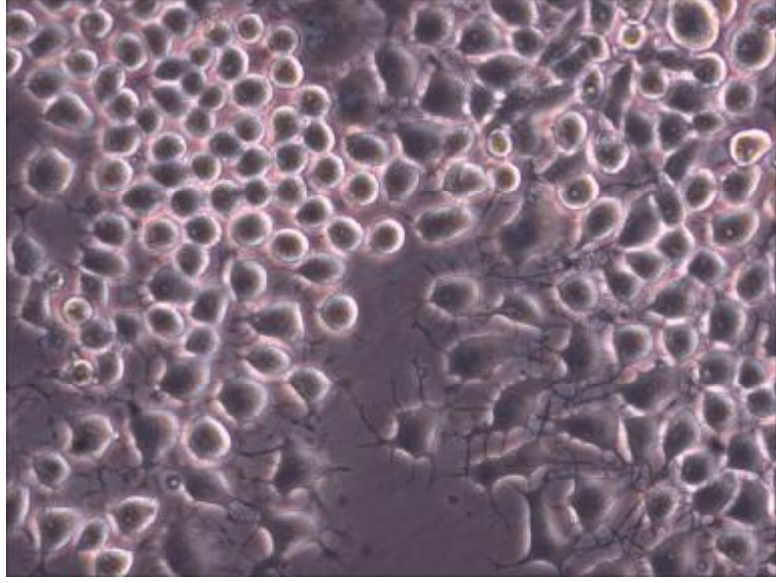
Kültür ortamında hücre davranışının alınan mikroskop görüntüleri üzerinde gerçekleştirilen ve yapılan üç deneyin ortalamalarından çıkan bu veriye göre, PRF ile karşılaştırıldığında KRF için toksik etkinin hem hücrelerin sayısal azalması şeklinde nekroz ile görülen makro bulgulara, hem de nörit inhibisyonu ile ılımlı toksik etkiye daha çok neden olduğu ayrıca bu etkinin NOS ve apoptozla ilişkili olarak ger ekleştĐi görüldü.



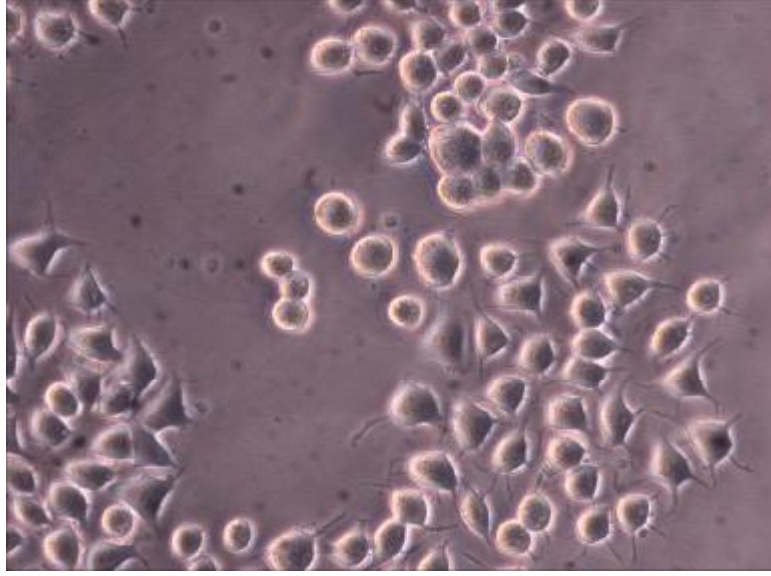
KONTROL CRF



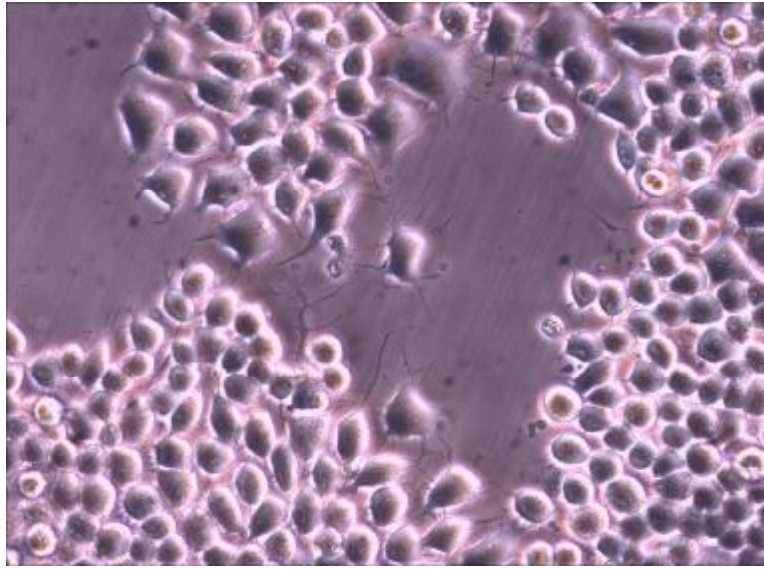
KONTROL PRF



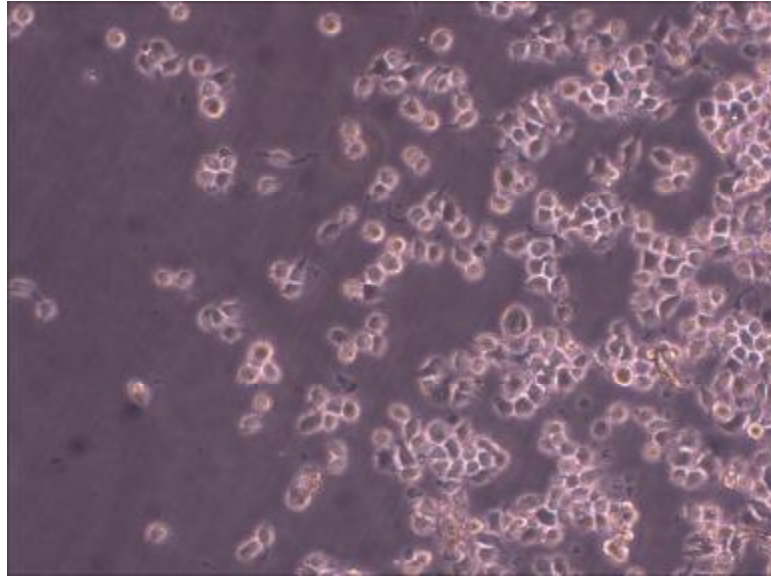
FARKLILAŞMIŞ KONTROL



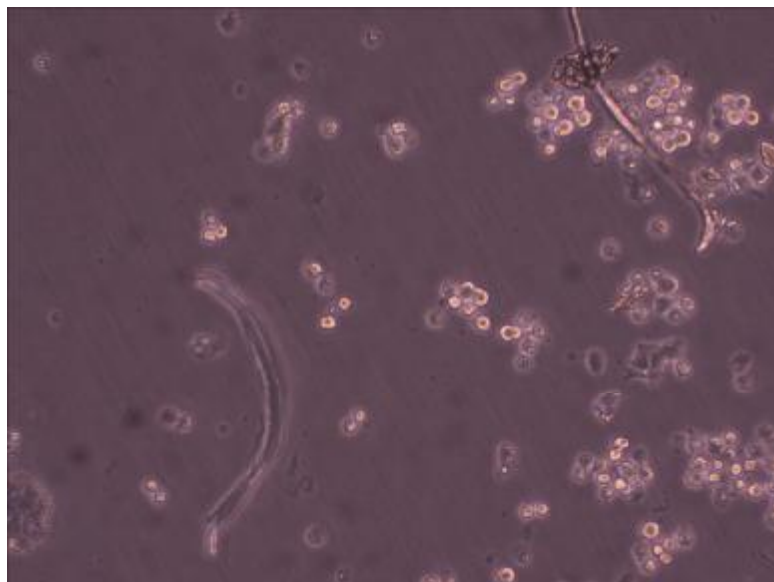
FARKLILAŞMIŞ CRF



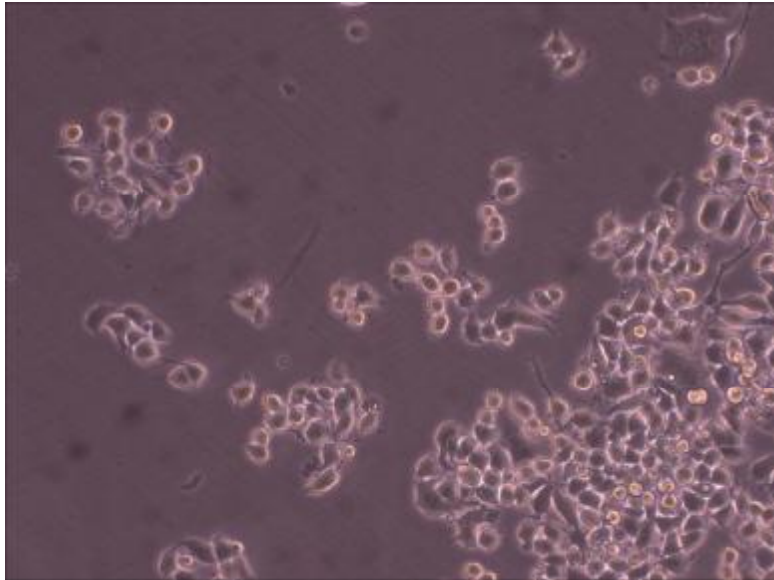
FARKLILAŞMIŞ PRF



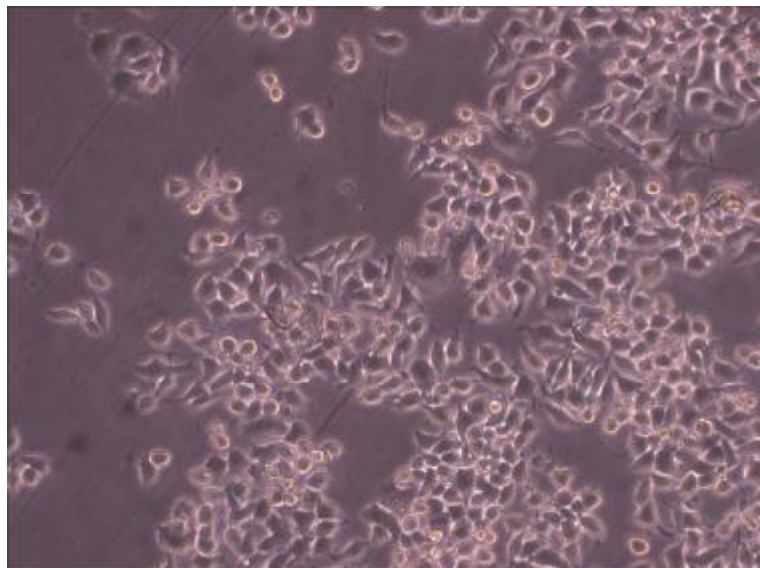
KONTROL



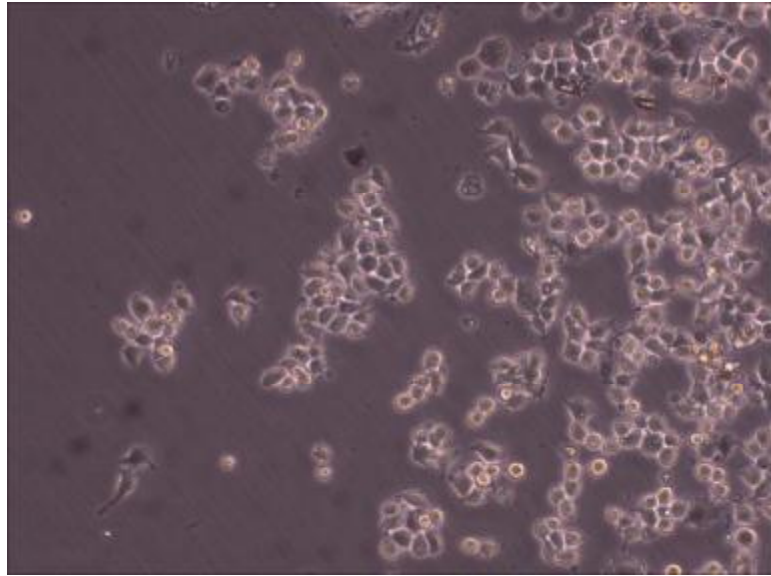
CRF 540 40



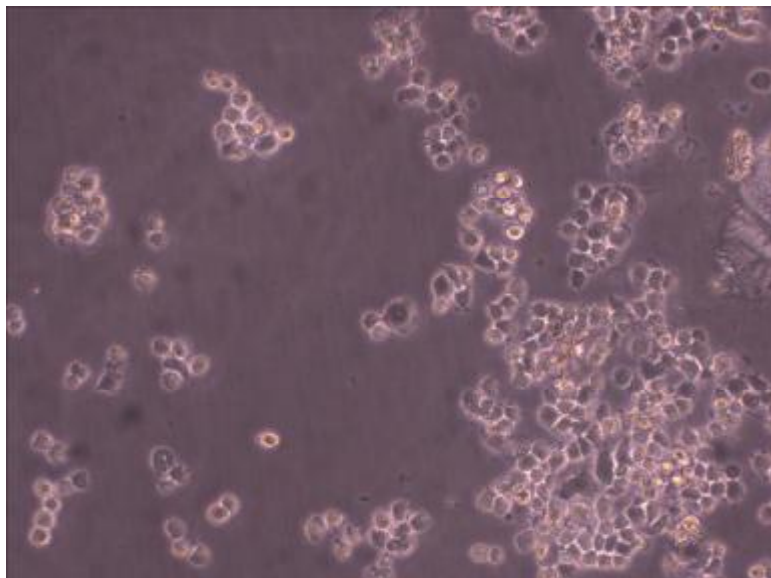
PRF 540 40



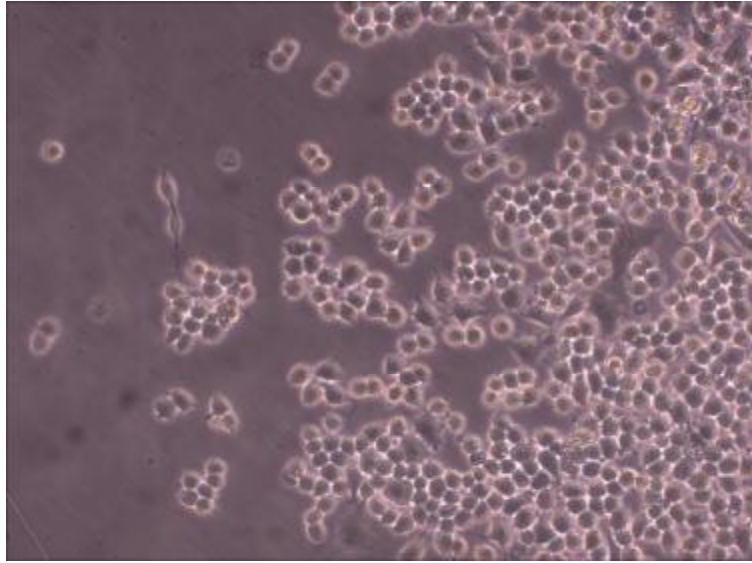
KONTROL



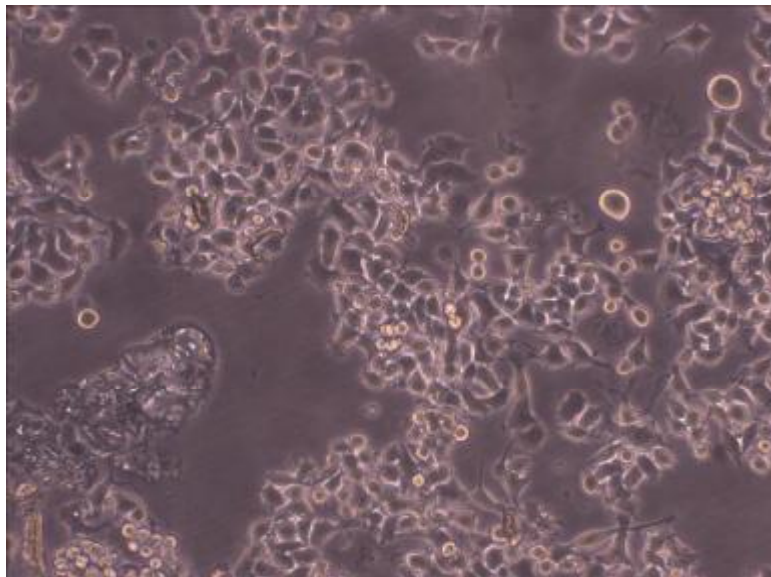
CRF 360 40



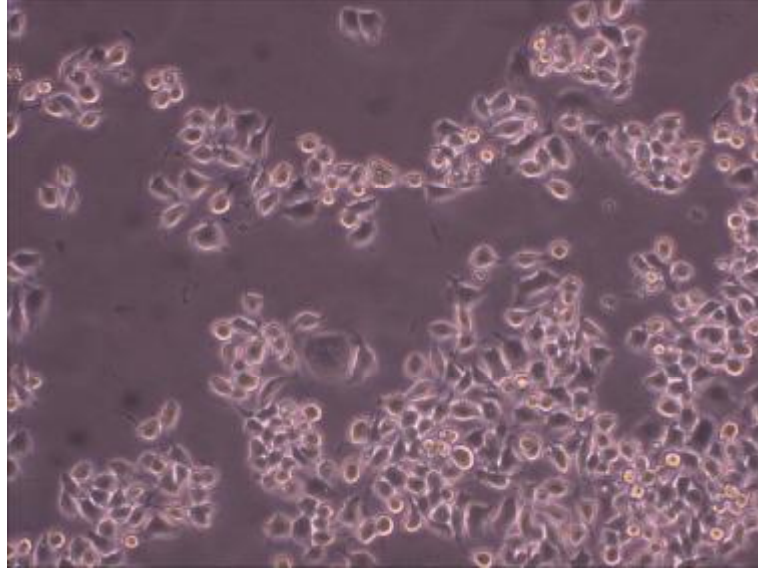
PRF 360 40



KONTROL

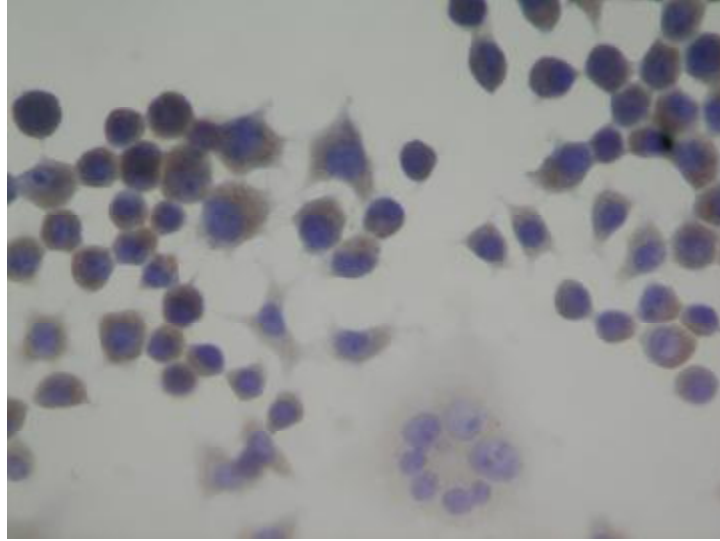


CRF 180 40

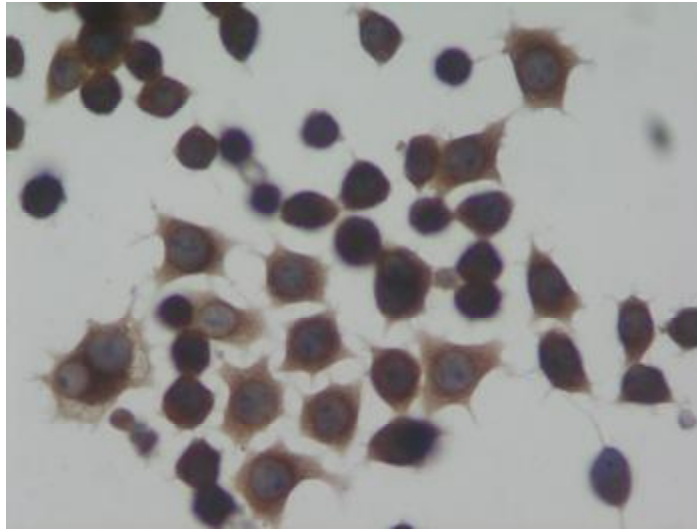


PRF 180 40

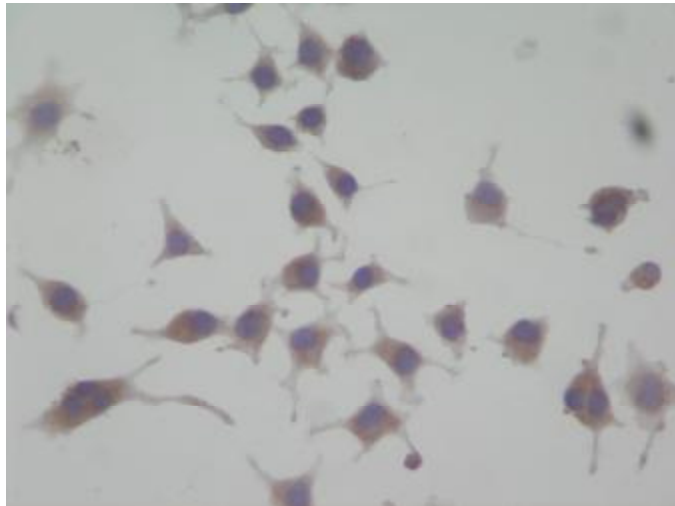
Şekil III.4 Değişik RF uygulamalarının hücresel düzeydeki oluşturduğu değişiklikler.



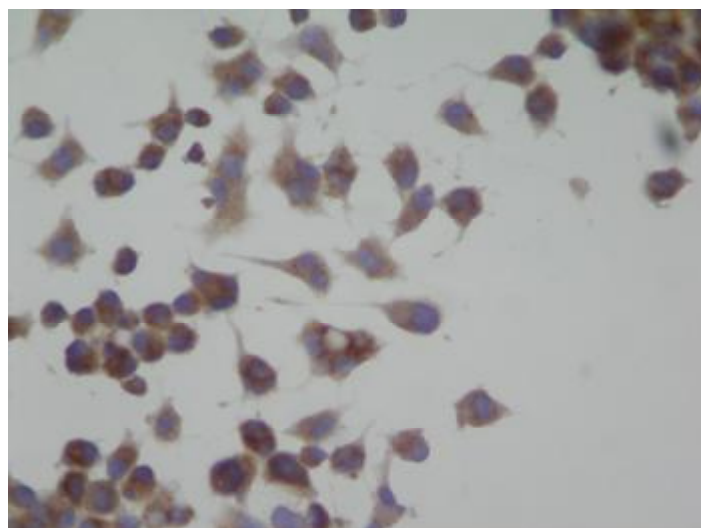
KONTROL iNOS



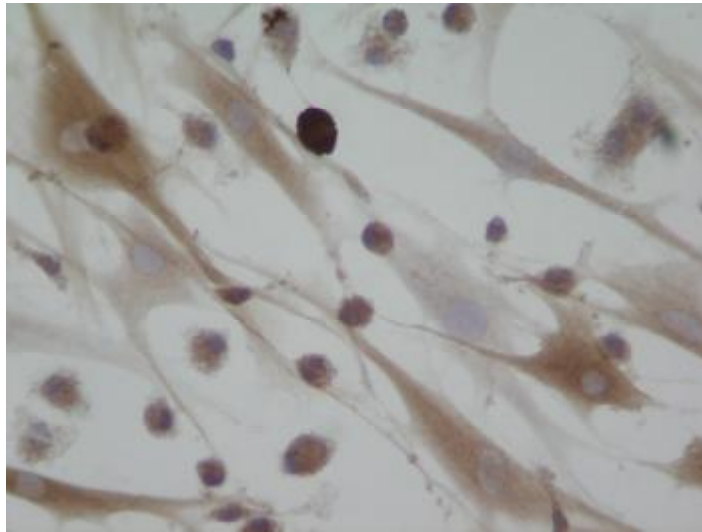
KONTROL eNOS



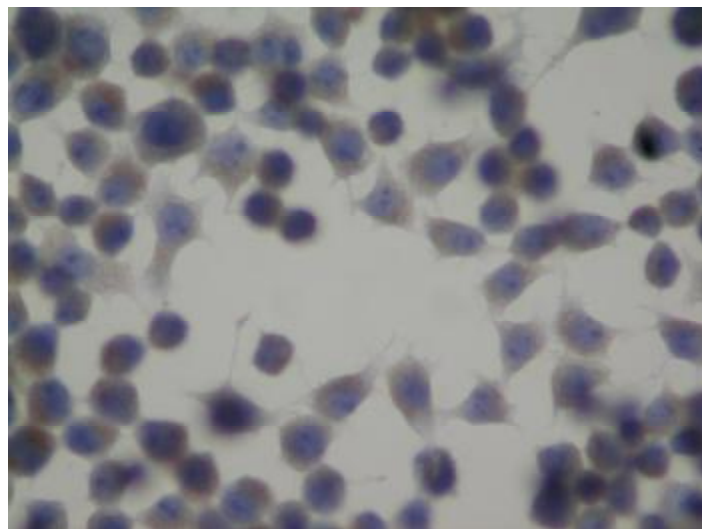
KONTROL TUNEL



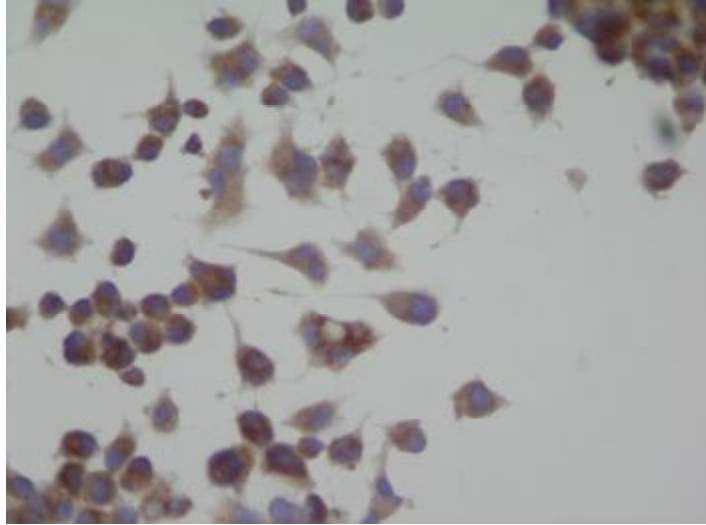
CRF iNOS



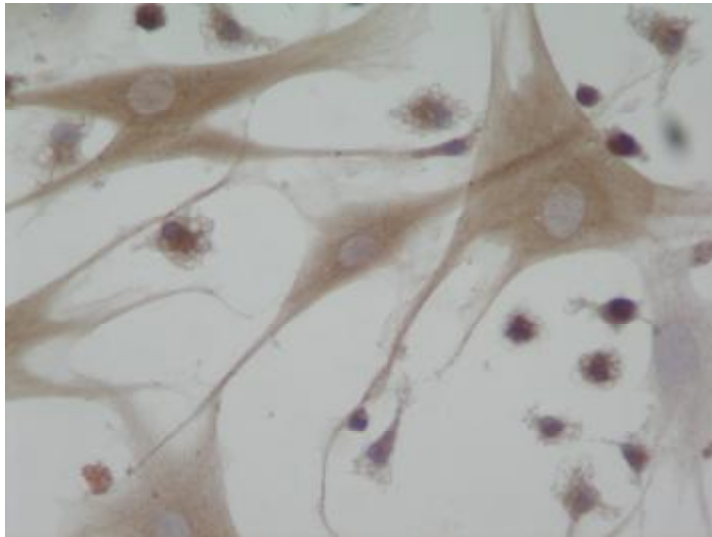
CRF eNOS



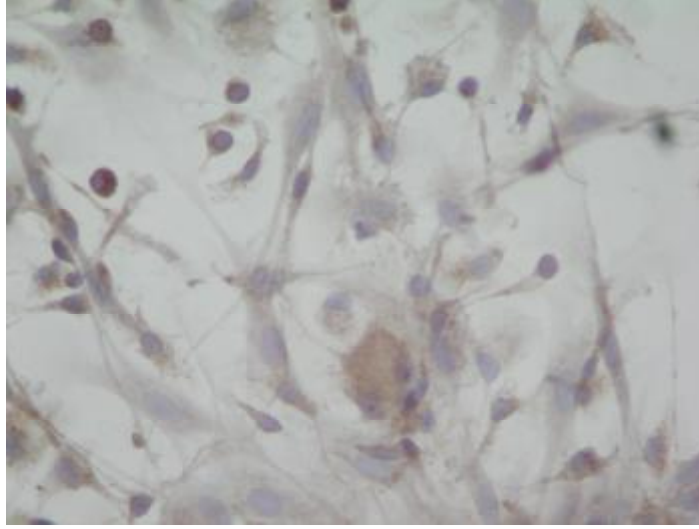
CRF TUNEL



PRF iNOS

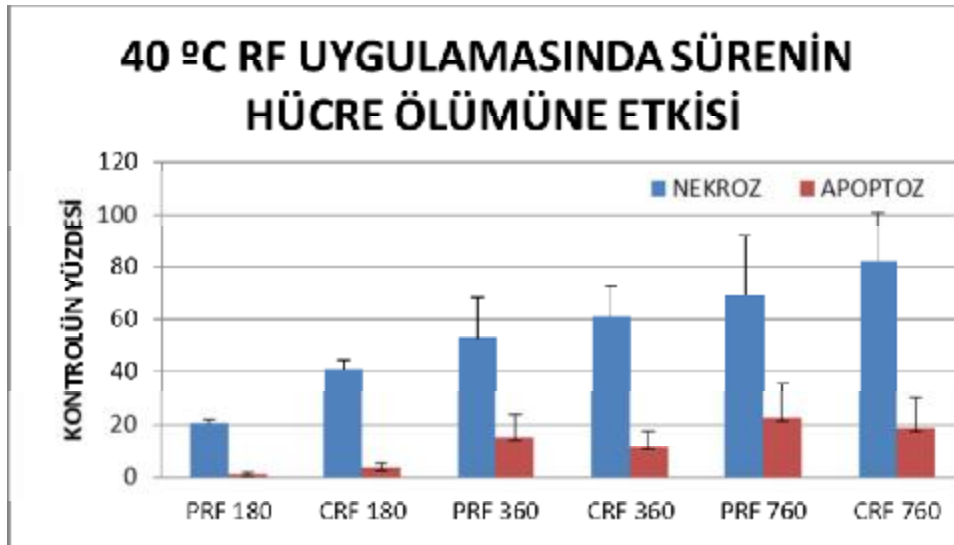


PRF iNOS

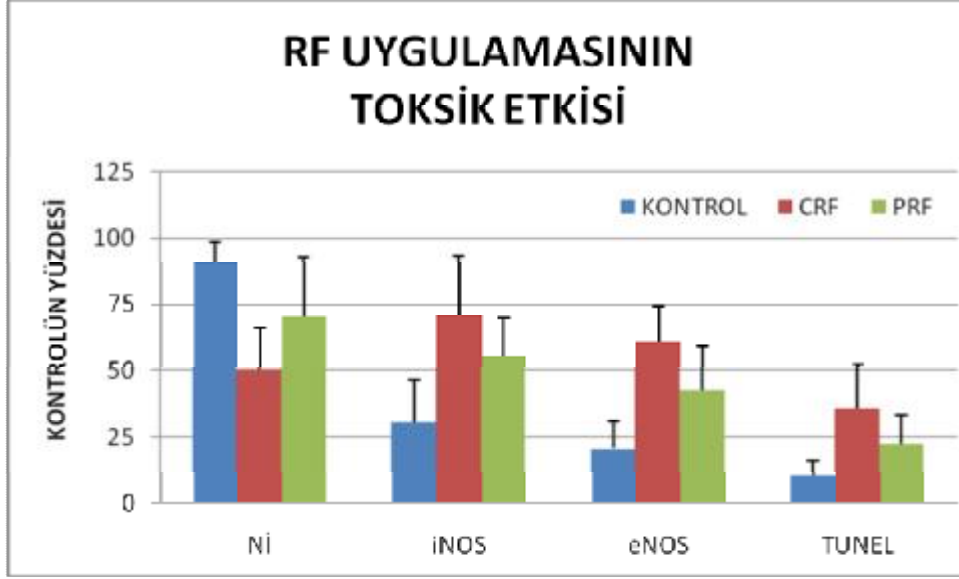


PRF TUNEL

Şekil III.5 Değişik RFuygulamalarında eNOS ,iNOS ve TUNEL boyamaları ile hücrelerdeki apoptotik değişiklikler.



Tablo III.1 40 °C RF uygulamasında sürenin hücre ölümüne etkisi.



Tablo III.2

V- TARTIŞMA

RF, 1965 yılında Rosomoff tarafından tanımlanmasından (1) bu yana , nöroablasyon yaratarak ağrı iletimini durdurmak amacıyla, klinikte kronik ağrı sendromlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Önceleri teknolojik olanaklar RF tedavisini sınırlamakta iken, özel kanüller ve elektrotlar geliştirildikçe, kesin anatomik lokalizasyonlarda, lezyonun boyutunu kontrol etme olanağı sağlanmış ve RF uygulamaları yaygınlaşmıştır (72). O zamandan bu yana, KRF, lomber radiküler ağrıdan (73) interkostal nevralji (74), servikojenik baş ağrıları (75) ve daha pekçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, KRF'nin yaygın kabul edilmesinin önündeki önemli bir engel, motor defisit ve deafferantasyon sendromu riskini barındırması olmuştur. KRF'de yüksek ısı ile oluşturulan bu nöroablasyon nörit benzeri reaksiyonlara, motor defisitlere ve deafferantasyon sekeline neden olabilmektedir.

Yan etkilerin azaltılması amacıyla devam eden yeni arayışlar, 1996 yılında Sluijter'in pulse RF (PRF)'i bulmasıyla sonuçlanmıştır. Sinir dokusunda termokoagülasyona neden olan ısı oluşumunun, klinikte görülen sonuçlardan sorumlu olduğu düşünülmesine rağmen, PRF destrüktif düzeyde ısı üretiminin olmadığı RF akımı oluşturmaktadır. Ağrı tedavisinde gelecek vaat eden bu yöntem, klinik olarak kanıtlanan etkinliği ve herhangi bir kalıcı nörolojik defisit yapmaması nedeniyle hızlı bir şekilde kabul edilmiş ve benimsenmiştir (2-8).

Elde edilen sonuçlar bu uygulamanın klinik kullanımını desteklese de, etki mekanizması hala belirsizdir. Deneysel olarak ganglion ve sinirler üzerindeki histolojik etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Biz çalışmamızda nöroblastoma hücre dizininde, nörotoksisite tarama testi, apoptosis ve oksidatif stres immünohistokimyası kullanarak, RF tedavisinin nöron hücre davranışına etkilerini araştırmayı amaçladık.

Kültür ortamının avantajları kullanılarak yapılacak in vitro çalışmalar ile toksisite araştırmaları kısıtlamaları bilindiği takdirde oldukça avantajlı bir yöntemdir. Kültür ortamını kullanmak, birçok deney hayvanı gerektiren temel çalışmalar kısmını kolaylaştırmaktadır. Daha sonra in vivo çalışmalar ile üç boyutlu ortamda toksik etki-klinik etki ilişkisi saptanabilmektedir. Ancak in vitro çalışmalarda sinir sistemi ve nöronlar ile ilgili toksisitede ortamın kompleksliği dezavantajına karşı, çok daha düşük maliyet söz konusu olabilmektedir.

Nöron hasarı nörit uzamasının inhibisyonundan başlayarak, hücre intiharı olan apoptozise kadar giden bir süreç olup, nitroz oksit üzerinden gerçekteşen oksidatif stres, bu davranışın en önemli bileşenini oluşturmaktadır. Bu nedenle RF uygulaması ile nöron üzerinde oluşacak oksidatif stres ve neden olacağı nörit inhibisyonu ile apoptozis düzeyi arasındaki ilişki, bu uygulamaların gelecekteki kullanımlarının yönlendirilmesi anlamında önemli bilgiler edinmemizi sağlayacaktır.

Çalışmamızda, üç boyutlu ortamdan uzaklaştırılmış nöronun, çıplak halde bulunduğu kültür ortamı şartlarında, klinikte yaygın olarak kullanılan RF uygulamalarının iki boyutlu ve tek tabakalı tek hücre ortamında toksik etkisi araştırıldı. Hücrenin uygulamalara verdiği tepkiler nekroz ölümünden apoptoz mekanizmasına ve beraberinde eşlik edebilecek oksidatif strese olan ilişkisi yönü ile incelendi. Alınan sonuçlar, RF uygulamasının uzun sürelerde hem KRF, hem PRF için ciddi toksik etki oluşturduğunu, KRF için bu etkinin daha belirgin olduğunu, ancak 180 sn gibi uygun sürelerde minimal derecede bir hasar ile gerçekteşirdiğini gösterdi. Bu hasar nörit inhibisyonu şeklinde ortaya kondu ve NOS ile apoptoz ilişkisi gösterildi. Özellikle KRF uygulamaları için NTT ile ortaya konan in vitro nörotoksik etkinin varlığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu

saptandı. Ayrıca steroid uygulamasının RF ile oluşan toksik etkide koruyucu olmadığı anlaşıldı.

RF uygulamalarının nöron üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında üç boyutlu in vivo ortam, ancak, belirgin toksik etkinin gösterilmesinde uygun olmakta ve kullanılan mekanizmaların anlaşılmasında zorluklar oluşturmaktadır. Bu nedenle iki boyutlu, in vivo ortamın kompleksliğinden arındırılarak basit ve mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına imkan veren, in vitro kültür ortamlarının kullanılması gerekli olmaktadır. Bu ortamlar, RF uygulamalarının nöron davranışına olan etkilerini araştırmak, uygulamanın olası zararlarını ortaya koymak ve bunların mekanizmalarını irdelemek açısından önem taşımaktadır. Bu mekanizmaların anlaşılması nöron üzerinden yapılan işlemlerde hücrenin vereceği yanıtların bilinmesine, ayrıca tedavi etkinliği, kalitesi ve uygulanabilirliğinin artırılmasına neden olacaktır. Böylece hasta ve tedavisi için yaşam kalitesinin artması sağlanacaktır.

Önceki çalışmalarda, RF uygulamasının miyelinli, miyelinsiz sinir liflerinde veya her ikisinde bazı yapısal hasarlara neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır (76). Küçük miyelinli lif yıkımını kastederek sinir dokusu üzerinde ısının bir lif-selektif etkiye sahip olduğunu ileri sürmüş, buna karşın (13) ve (77), hem küçük hem de büyük liflerin gelişigüzel olarak yıkıma uğradığını ileri sürmüştür (78). Köpeklerde yapılan trigeminal RF'den, 14 gün sonra, ganglion hücrelerinde masif nekroz bildirmiştir (79).

KRF uygulamasında herhangi bir miyelinli veya miyelinsiz sinir hasarı görülmemiştir. De Louw ve ark.'ları aynı çalışmalarında, Letcher, Uematsu ve Smith tarafından gözlemlenen hasarın, şu anki klinik pratikte kullanılan çok daha büyük elektrotların kullanılmasından ve sinir dokusunun içine yerleştirilmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. De Louw ve ark. modern, yüksek göstergeli elektrotlar kullanmış ve daha önceki çalışmalarda olduğu gibi, ganglion içine yerleştirilen elektrotlar aracılığı ile değil de,

dorsal root gangliyonuna (DRG) bitişik şekilde RF akımı uygulamıştır. Raporlarında, hücresel hasarın bir göstergesi olabilecek olan MIB-1 aktivitesinde önemli bir artış söz konusu olsa da, DRG'de ışık mikroskobu düzeyinde gözlemlenebilir hiçbir hasar olmadığını belirtmiştir(80). Yaptığı doku kültürü çalışmasında rat dorsal root gangliyonları 3 gruba ayrılmıştır. 1. gruba 38°C PRF, 2. gruba yine 38°C KRF 120 sn süresince uygulanmıştır. 3. grup sham grubu olarak değerlendirilmiştir. Sonraki günlerde yapılan incelemelerde, PRF uygulanan dokuda iyileşme saptanırken, KRF grubunda böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın ana bulgusu DRG'nin PRF'e maruz bırakılması ile spinal kordun gri maddesinin yüzeyel laminasında c-fos ekspresyonunun aktivasyonudur. PRF dorsal boynuz lamina 1 ve 2'sinde c-fos ekspresyonunu indüklemiş, KRF bunu yapmamıştır. PRF'e maruz bırakılmış DRG'nin hem aynı tarafında hem karşı tarafında artmış sayıda c-fos ekspresyonu gözlemlenmiştir. PRF ve KRF arasında doku sıcaklıkları arasında belirgin bir fark gözlemlenmediği için bu modelde c-fos ekspresyonunda cerrahi prosedür ve ısı etkileri dikkate alınmamıştır. Dorsal boynuzdaki gözlenen değişiklikler bu çalışmada kullanılan KRF'ten 40 kat daha büyük amplitüdü olan PRF sinyalleri ile oluşan dalgalı akım ile ilişkilendirilmiştir.

Erdine ve ark. (81), tavşan dorsal root ganglionu üzerinde KRF ve PRF etkilerini araştırdıkları çalışmalarında KRF, PRF, kontrol, sham olmak üzere 4 grup oluşturmuşlar; KRF 67°C 60 saniye ve PRF 120 saniye süre ile, oluşan ısı 42°C'yi geçmemek koşuluyla uygulamışlardır. Uygulamadan 2 hafta sonra yapılan incelemelerde; ışık mikroskobide hiçbir miyelinli veya miyelinsiz sinir hücresinde hasara rastlamamışlardır. Ancak elektron mikroskobide, KRF grubunda dev sitoplazmik boşluklar, aşırı genişlemiş endoplazmik retikulum keseleri ve dejenere mitokondria ile çekirdek zarı kaybı gözlemlenmiştir. PRF grubunda ise daha az sayıda genişlemiş sitoplazmik boşluklar ve endoplazmik retikulum

keseleri gözlenmiş, ancak çekirdek zarında bir hasara rastlanmamıştır. Kontrol ve *sham* grubunda ise hiçbir hasara rastlanmamıştır.

Sıçan siyatik siniri üzerinde KRF ve PRF'in nöral doku üzerine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada, kontrol, sham, KRF 40, KRF 80 ve PRF olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Her grup için 6 sıçan kullanılmıştır. KRF40 grubunda, 90 saniye süreyle 40°C KRF, KRF80 grubunda, 90 saniye süreyle 80°C KRF, PRF grubunda, 240 saniye süreyle, 45 V, 42°C'yi geçmeyecek şekilde PRF uygulanmıştır. Kontrol grubundaki deneklere hiçbir işlem yapılmamıştır. Sham grubunda RF elektrodu yerleştirilmiş ancak RF enerjisi verilmemiştir. PRF uygulamaları ile oluşan ödem, hücre ve miyelin patolojilerinin mikroskopik ve morfometrik incelemeleri yapılarak, KRF40 ve 80 uygulamalarına göre daha güvenli olduğu saptanmıştır (9). Sıçanların dorsal kök ganglionunda ve siyatik sinirinde 42°C'de uygulanan KRF ve PRF'nin etkilerinin karşılaştırıldığı başka bir histopatolojik çalışmada (82), geçici endonöral ödem ve kollajen birikiminden başka hiçbir yapısal değişiklik görülmemiştir.

Ultrastrüktürel aksonal değişikliklerin incelendiği daha yakın tarihli çalışmalarda, PRF maruziyeti sonrasında mikroskopik hasar, anormal mitokondri membran ve morfolojisi, ve mikrofilamentler ve mikrotübüllerde bozulma ve disorganizasyon varlığı gösterilmiştir (83). Başka bir benzer çalışmada, hasarlı miyelinli aksonlarda 120 sn'lik PRF uygulaması sonrasında sadece miyelin yapıda bir ayrılma görülmüştür. Buna ek olarak, bu grupta yeni yapılan miyelinli aksonlar da gözlenmiştir (84). Bu histolojik bulguların, PRF uygulaması sırasında elektrik alanlara maruz kalan dokularca üretilen yüksek transmembran potansiyellerin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır.

Pulse radyofrekansının sıçanların lomber dorsal kök ganglionu üzerindeki etkilerinin, akut evrede morfolojik etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, 120 saniye

boyunca 42°C PRF uygulanacak grup ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturmuşlardır. Işık mikroskopunda, RF uygulanmış ve kontrol grubu hayvanlar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir; buna karşılık, transmisyon elektron mikroskopunda, T gangliar hücrelerinin, genişlemiş sisternaları ve pek çok sayıda vakuolü olan anormal şekilde bol düz retikulum içerdiğini, miyelinli aksonların patolojik özellikler gösterdiğini ve bunların miyelin kılıfının yapışık olmadığını görmüşlerdir. Miyelinsiz aksonların ise normal şekil ve boyutlara sahip olduklarını ve bunları çevreleyen Schwann hücrelerinin plazma membranlarının sağlam olduğunu izlemişlerdir. Akut aşamada elde edilen sonuçlarını, PRF prosedürünün sinir liflerinin miyelin kılıfını tahrip ettiği yönünde rapor etmişlerdir.

PRF ile doku yıkımı ihtimali olduğu, 60°C ve üzerindeki sıcaklıklarda PRF elektrodu kullanılarak in vitro ortamda yapılan yumurta akı çalışmasıyla da kanıtlanmıştır (85). 60°C veya üzerinde KRF, yumurta akında görülebilir bir koagülasyon oluşturmuştur. Koagülasyon paterni, ucun etrafında radyal ve elektrodun uzun eksenine dik şekilde oluşmuştur. PRF enerjisi ile 42°C 'de yumurta akındaki koagülasyon görünmemekte ancak 60°C'de görülebilmektedir. Koagülasyon uç kısmın yanı sıra, elektrodun şaftının açığındaki kısmı boyunca oluşmaktadır. 60°C'nin üzerindeki PRF'in oluşturduğu koagülasyon, kalitatif olarak, KRF ile oluşturulan koagülasyon ile boyut ve şekil olarak benzerdir. Ancak, iğne ucundaki koagülasyon yumağının yoğunluğu, test edilen tüm sıcaklıklarda KRF'de PRF'ye göre biraz daha yüksek bulunmuştur.

Düşük ısı kullanılarak, ısı etkisinin önemsiz hale getirildiği bir başka çalışmada (Tattersall JE ve ark., 2001), sıçan hipkampüs kesitlerinde, epileptiform aktivite 4-aminopyridine (50-100 microM) ile uyarıldığında ısı oluşmadan da aktivasyon görüldüğü gösterilmiştir. Isı faktörünün tek başına etken olmadığının vurgulanmasında, PRF uygulamasının daha az toksik etki göstermesinin önemli olabileceği düşünülmüştür.

VI-SONUÇ

RF uygulamalarında 40°C kullanıldığında, süre 180 sn'den 540 sn'ye uzadıkça hücre kaybının arttığı gözlemlendi. 180 sn ve 40 °C uygulamalarında hücrelerin daha az öldüğü, genellikle sağlıklı ve iyi görünümde oldukları görüldü. En az toksik etki nörit inhibisyonu şeklinde idi ve her alanda farklı düzeylerde gerçekleşmekte, heterojen bir karakter göstermekteydi. 60°C uygulamalarında hücrelerin 40°C'ye göre çok daha fazla hasara uğradıkları ve öldükleri ve bu etkilenmenin KRF uygulamasında daha belirgin olduğu bulundu.

RF uygulamalarının yaptığı nörit inhibisyonu oksidatif stres ile ilişkisi ve bu ilişkinin getirdiği apoptoz mekanizmasının varlığı araştırıldığında, kontrol örneklerinde bazal düzeyde bir iNOS ve eNOS ortamının bulunduğu ayrıca az miktarda apoptotik hücrenin olduğu anlaşıldı. RF süresi ile belirgin bir biçimde NOS varlığının arttığı ve beraberinde apoptotik hücrelerinde çoğaldığı gözlemlendi. Bu etkinin KRF uygulamasında, PRF uygulaması ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu anlaşıldı.

Morfometrik analizlerde, RF süresi uzadıkça oldukça belirgin bir şekilde hücre ölümü olduğu, ancak apoptotik hücredeki artışın aynı belirginlikte olmadığı bulundu. 180 sn, 40°C'de hücre ölümünün en az gerçekleştiği, 60°C uygulamasının anlamlı ($p<0,05$) bir toksik etki oluşturduğu ancak apoptotik hücre sayısında bir değişiklik oluşturmadığı bulundu.

PRF ile karşılaştırıldığında KRF için toksik etkinin hem hücrelerin sayısal azalması şeklinde nekroz ile görülen makro bulgulara, hem de nörit inhibisyonu ile ılımlı toksik etkiye daha çok neden olduğu ayrıca bu etkinin NOS ve apoptozla ilişkili olarak gerçekleştiği görüldü. PRF'in nörotoksisite açısından daha güvenli bir yöntem olduğu, ayrıca steroid uygulamasının in vitro ortamda koruyucu etki oluşturmadığı kanısına varıldı.

VII- ÖZET

Konvansiyonel RF (KRF)'de yüksek ısı ile oluşturulan bu nöroablasyon; nörit benzeri reaksiyonlara, motor defisitlere ve deafferantasyon sekeline neden olabilmektedir. Yan etkilerin azaltılması amacıyla devam eden yeni arayışlar, 1996 yılında Sluijter'ın pulse RF (PRF)'i bulmasıyla sonuçlanmıştır. Sinir dokularında termokoagülasyona neden olan ısı oluşumunun, klinikte görülen sonuçlardan sorumlu olduğu düşünülmesine rağmen, PRF, destrüktif düzeyde ısı üretiminin olmadığı RF akımı oluşturmaktadır. PRF klinik olarak kanıtlanan etkinliği ve herhangi bir kalıcı nörolojik defisit yapmaması nedeniyle hızlı bir şekilde kabul edilmiş ve benimsenmiştir. Elde edilen klinik sonuçlar PRF'nin kullanımını desteklese de, etki mekanizması hala belirsizdir.

Bu çalışmada amaç, nöroblastoma hücre dizininde, nörotoksisite tarama testi, apoptosis ve oksidatif stres immünohistokimyası kullanarak, RF tedavisinin nöron hücre davranışı üzerine olan etkilerini araştırmaktır. RF uygulaması ile nöron üzerinde oluşacak oksidatif stres ve neden olacağı nörit inhibisyonu ile apoptosis düzeyi arasındaki ilişki, bu uygulamaların gelecekteki kullanımlarının yönlendirilmesi anlamında önemli bilgiler edinmemizi sağlayacaktır.

RF uygulamalarının nöron üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında üç boyutlu in vivo ortam, ancak, belirgin toksik etkinin gösterilmesinde uygun olmakta ve kullanılan mekanizmaların anlaşılmasında zorluklar oluşturmaktadır. Bu nedenle iki boyutlu, in vivo ortamın kompleksliğinden arındırılarak, basit ve mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına imkan veren, in vitro kültür ortamlarının kullanılması gerekli olmaktadır. Bu ortamlar, RF uygulamalarının özellikle PRF'in nöron davranışına olan etkilerini araştırmak, uygulamanın olası zararlarını ortaya koymak ve bunların mekanizmalarını irdelemek açısından önem taşımaktadır.

Çalışmada NaB2 fare nöroblastoma dizin hücreleri kullanıldı. 24 adet hücre kültür kabı kullanılan çalışmada, uygulanan RF süresine göre 4 ayrı grup oluşturuldu. Birinci gruba 180 saniye, ikinci gruba 360 saniye, üçüncü gruba 540 saniye sürelerle RF uygulandı. Dördüncü gruba ise RF uygulanmadı ve kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu 4 grup 40°C KRF, 40 °C PRF, 60°C KRF ve 60°C PRF olarak 4'er tane alt gruba ayrıldı. Kontrol grubu ve 180 sn'lik I. Grup'un birer hücre dizinine steroid eklenerek, steroidin lezyon üzerine etkileri araştırıldı. RF uygulamalarının sonrasında iNOS, eNOS ve TUNEL boyamaları yapıldı. Faz kontrast mikroskop görüntüleri bilgisayar ortamına alınarak morfometrik analizleri yapıldı.

540 sn ve 40 °C kullanımı sonucunda belirgin hücre kaybının olduğu gözlemlendi. Sürenin azaltıldığı 360 sn ve 40°C uygulamalarında yine belirgin hücre ölümünün gerçekleştiği ve bunun KRF ile daha belirgin olduğu anlaşıldı. Sürenin daha da azaltıldığı 180 sn ve 40 °C uygulamalarında hücrelerin yaklaşık kültür kabının üçte biri şeklinde daha az öldüğü, genellikle sağlıklı ve iyi görünümde oldukları görüldü. Bu görünümün PRF uygulamalarında KRF uygulamalarına göre daha belirgin olduğu saptandı. 180 sn ve 60 °C uygulamalarında hücrelerin 360 sn sürelerindeki benzer düzeyde etkilendikleri ve bu etkilenmenin KRF uygulamasında daha belirgin olduğu bulundu.

Hücre ölümünün uygulamalar arasında fark oluşturmadığı 180 sn ve 40 °C uygulamalarının büyük büyütmelelerinde RF etkisinin nörit inhibisyonu şeklinde görüldüğü saptandı. Nörit uzatma her alanda farklı düzeylerde gerçekleşirken RF uygulamalarının sonrasında oluşan toksik etkinin heterojen olduğu görüldü.

RF uygulamalarının yaptığı nörit inhibisyonu oksidatif stres ile ilişkisi ve bu ilişkinin getirdiği apoptoz mekanizmasının varlığı araştırıldığında, kontrol örneklerinde bazal düzeyde bir iNOS ve eNOS ortamının bulunduğu ayrıca az miktarda apoptotik

hücrenin oluştuğu anlaşıldı. RF süresi ile belirgin bir biçimde NOS varlığının arttığı ve beraberinde apoptotik hücrelerinde çoğaldığı gözlemlendi. Bu etkinin KRF uygulamasında, PRF uygulaması ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu anlaşıldı.

Morfometrik analizlerde, RF süresi uzadıkça oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde hücre ölümü oluştuğu, ancak apoptotik hücredeki artışın aynı anlamlılıkta olmadığı bulundu. 180 sn, 40°C’de hücre ölümünün en az gerçekleştiği, 60°C uygulamasının anlamlı ($p<0,05$) bir toksik etki oluşturduğu ancak apoptotik hücre sayısında bir değişiklik oluşturmadığı bulundu. 180 sn ve 40°C PRF uygulamalarında daha az oranda nörit inhibisyonu ortaya çıkarken ($p<0,05$), KRF uygulamasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) nörit inhibisyonu gerçekleştiği görüldü. Benzer sonuçlar iNOS ve eNOS için bulunurken, TUNEL boyamalarında en az apoptotik etkinin KRF uygulamasında olduğu saptandı.

PRF ile karşılaştırıldığında KRF için toksik etkinin hem hücrelerin sayısal azalması şeklinde nekroz ile görülen makro bulgulara, hem de nörit inhibisyonu ile ılımlı toksik etkiye daha çok neden olduğu ayrıca bu etkinin NOS ve apoptozla ilişkili olarak gerçekleştiği görüldü.

Sonuç olarak RF uygulamalarında artan süre ve ısı ile toksik etkinin de arttığı, KRF uygulamalarında belirgin hasar oluştuğu ve PRF uygulaması ile bu hasarın engellenemediği ancak azaltılabildiği kanısına varıldı. Steroid uygulamasının in vitro ortamda koruyucu etki oluşturmadığı görüldü.

VIII-SUMMARY

THE COMPARISON OF NEUROABLATIVE EFFECTS OF CONVENTIONAL AND PULSE RADIOFREQUENCY TECHNIQUES

Neuroablation generated by the high-temperature in conventional RF (CRF) can lead to neuritis-like reactions, motor deficits and deafferentation sequels. The ongoing new searches in order to reduce the side effects resulted in the discovery of pulsed RF (PRF) by Sluijter in 1996. Although formation of heat causing “thermocoagulation” of the nervous tissues is thought to be responsible of the clinical outcome, pulsed radiofrequency (PRF) delivers the RF current without producing destructive levels of heat. Pulsed radiofrequency (PRF) has been rapidly accepted for its clinically demonstrated effectiveness and the lack of any permanent neurological deficits. Although the clinical results support the use of PRF, the mechanism of action is still unclear.

In this study, the aim is to investigate the effects of RF treatment on the behavior of neuronal cells by using neurotoxicity screening test and apoptosis and oxidative stress immunohistochemistry in neuroblastoma cell line. The relationship between the oxidative stress on the neurons caused by PRF application and subsequent inhibition of neuritis and the level of apoptosis will provide important information in terms of guidance of future uses of these applications.

In understanding the effects of RF applications on neurons, three-dimensional in vivo environment becomes available to demonstrate only the significant toxic effects and poses difficulties in understanding the mechanisms used. Therefore, the two-dimensional in-vitro culture environments which are simple and allowing a better understanding of the mechanisms are required by eliminating the complexity of in-vivo environments. These environments are important in terms of investigating the effects of RF applications,

especially RF applications, on the neuronal behavior, demonstrating the potential hazards of the application, and examining their mechanisms of actions.

In this study, rat neuroblastoma NaB2 cell line was used. 24 cell culture containers were used, and 4 different groups were created based on the duration of the RF. The durations of RF application were 180 seconds, 360 seconds and 540 seconds in the first, second and third groups, respectively. The fourth group was not underwent RF application and considered as a control group. Each of these 4 groups were divided into four sub-groups as CRF at 40°C, PRF at 40°C, CRF at 60°C and PRF at 60°C. Steroid was applied in one of each cell line of the control group and the first group (180 sec), and the effects of steroids on the lesion were investigated. After RF applications, iNOS, eNOS, and TUNEL staining were performed. Phase contrast microscope images were transferred to a computer, and morphometric analysis was performed.

A significant cell loss was observed as a result of the use of RF application for 540 sec at 40°C It was proven that significant cell death occurred with the applications for 360 sec at 40°C, and this was more pronounced with the use of CRF. It was demonstrated that the rate of cellular death was lower by approximately one-third of the culture container, and they generally had a healthy appearance with the applications for 180 sec at 40°C This appearance was found to be more evident in the PRF applications than the CRF applications. It was found that the cells in the 180 sec at 60°C group were affected by a similar level that of 360 sec groups and that this influence was more pronounced in CRF application.

The cell death was determined to not constitute a difference between applications; the effect of RF applications for 180 sec at 40°C was seen as the inhibition of neuritis at

high magnification. Different levels of neuritis extension occurred in every field, and the toxic effect that occurred after the RF applications was seen to be heterogeneous.

When the relationship between the inhibition of neuritis caused by RF applications and oxidative stress, and the presence of apoptosis mechanism brought by this relationship were investigated, the basal level of iNOS and eNOS media were detected and a small amount of apoptotic cell were found in the control samples. There is a marked increase in the presence of the NOS with the increase in RF duration, accompanied by an increase in apoptotic cells. This effect was found to be more pronounced with the CRF application when compared with the PRF application.

In morphometric analysis, it was found there is a significant increase in cell death with increasing RF durations ($p < 0.001$), but not in the apoptotic cells. The amount of cell death was lowest with the application for 180 sec at 40°C, and the application at 60°C caused a significant increase in toxic effect ($p < 0.05$), but not in the number of apoptotic cells. While a lesser extent of inhibition of neuritis occurred in PRF applications for 180 sec and 40°C ($p < 0.05$), quite significant level of inhibition of neuritis occurred in CRF application ($p < 0.001$). While similar results were available for iNOS and eNOS, the least apoptotic effect was found to be with the CRF application in TUNEL staining.

When compared to the PRF, the toxic effect of CRF was found to cause macro-findings associated with the necrosis characterized by the numerical decline in the cells, and mostly moderate toxic effects with the inhibition of neuritis. The latter effect was also found to be associated with NOS and apoptosis.

In conclusion, we concluded that the toxic effect was increased with the increasing duration and temperature in RF applications, a significant damage occurred in CRF

applications, and this damage can be lessened but not eliminated with PRF application.

Steroid application was found to have no in vitro protective effect.

IX – KAYNAKLAR

1. Rosomoff H. L., Carrol F., Brown J., Sheptak P. Percutaneous radiofrequency cervical cordotomy technique. *J Neurosurg*:1965; 23: 639-644.
2. Munglani R. The longer term effect of pulsed radiofrequency for neuropathic pain. *Pain*: 1999; 80: 437–439.
3. Geurst JW, van Wijk RM, Wynne HJ, Hammink E, Buskens E, Lousberg R et al. Radiofrequency lesioning of dorsal root ganglia for chronic lumbosacral radicular pain. *Lancet*: 2003; 361:21–26.
4. Mikeladze G, Espinal R, Finnegan R, Routon J, Martin D. Pulsed radiofrequency application in treatment of chronic zyapophyseal joint pain. *Spine*: 2003; 419:170–177.
5. Shah RV, Racz GB. Long-term relief of posttraumatic headache by sphenopalatine ganglion pulsed radiofreuency lesioning: a case report. *Arch Phys Med Rehabil*: 2004; 85: 1013–1016.
6. Sluijter ME, Van Kleef M. Characteristics and mode of action of radiofrequency lesions. *Curr Rev Pain*: 1998; 2:143–150.
7. Sluijter ME, Cosman ER, Rittman WB, Van Kleef M. The effects of pulsed radiofrequency fields applied to the dosal root ganglion—a preliminary report. *Pain Clin*: 1998; 11:109–117.
8. Van Zundert J, Brabant S, Van de Kelft E, Vercruyssen A, Van Buyten JP. Pulsed radiofrequency treatment of the Gasserian ganglion in patients with idiopathic trigeminal neuralgia. *Pain*: 2003; 104:449–452.

9. Tekin I, Mirzai H, Ok G, Erbuyun K, Vatansever D. A comparison of conventional and pulsed radiofrequency denervation in the treatment of chronic facet joint pain. *Clin J Pain*: 2007; 23(6): 524–529.
10. Kirschner M. Zur Elektrochirurgie. *Arch Klin Chir*: 1931; 167761-5.
11. Hunsperger R. Quantitative Ausschaltung von Nervengewebe durch Hochfrequenzkoagulation. *Helv Physiol Acta*: 1953; 283-304.
12. Sweet W. H., Wepsic J. G. Controlled thermocoagulation of trigeminal ganglion and rootlets for differential destruction of pain fibres. *J Neurosurg*: 1974; 40:143-156.
13. Uematsu S. Percutaneous electrothermocoagulation of spinal nerve trunk, ganglion and rootlets. In *current technique in operative neurosurgery*, Eds. Schmidel H. H., Sweet W. S., Grune and Stratton, New York, 1977.
14. Sluijter M. E., Mehta M. Treatment of chronic back and neck pain by percutaneous thermal lesions. In *Persistent pain, modern methods of treatment* Eds. Lipton S., Miles J., Academic Press: 1981; Vol. 3, 141-179.
15. Cosman E. R., Nashold B.S., Ovelman- Levitt J. Theoretical aspects of radiofrequency lesions in the dorsal root entry zone. *Neurosurgery*: 1984; 945- 950.
16. Slappendel R, Crul BJP, et al. The efficacy of radiofrequency lesioning of the cervical spinal dorsal root ganglion in a double blinded randomized study. *Pain* 1997; 73: 159–63.
17. Van Kleff M. Radiofrequency lesions adjacent to the dorsal root ganglion. Thesis. Datawyse, Maastricht 1996.
18. Sluijter M. E. Radiofrequency, The lumbosacral region. FlivoPress, Switzerland 2001; 50-1.
19. Cosman E. R., Rittman W. J. Physical aspects of radiofrequency energy applications. Futura Publishing Company Inc. New York 1994; 13-23.

20. Ruiz- Lopez R. Radiofrequency for the treatment of chronic pain. In *Textbook of Regional Anesthesia*. Ed. Raj P. P. Churchill Livingstone: USA, 2002; 619-645.
21. Moringlane J. R., Koch R., Schafer H., Ostertag C. B. Experimental radiofrequency (RF) coagulation with computer- based online monitoring of temperature and power. *Acta Neurochir*: 1989; 96: 126-131.
22. Fox J. L. Experimental relationship of radiofrequency electrical current and lesion size for application to percutaneous cordotomy. *J Neurosurg*: 1970; 33: 415- 421.
23. Cosman E. R., Comsan B. J. Methods of making nervous system lesions In *Wilkins R. H., Renchary S. S., McGraw- Hill, eds. Neurosurgery New York: 1985; 2490-9.*
24. Cahana A: Pulsed radiofrequency: a neurobiologic and clinical reality *Anesthesiology*: 2005; 103: 1311, 1313–1314.
25. Cahana A, Van Zundert J, Macrea L, et al. Pulsed radiofrequency, current clinical and biological literature available. *Pain Med* 2006; 7; 411–423.
26. Cosman ER. A comment on the history of the pulsed radiofrequency technique for pain therapy. *Anesthesiology*: 2005; 103(6): 1312.
27. Weaver JC. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem*: 1993.
28. Sluijter ME, van Kleef M . Pulsed radiofrequency. *Pain Med*: 2007; 8(4): 388- 389.
29. Pockett S. Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg* : 1995; 80(1): 173–179.
30. Smith SL, Sadler CJ, Dodd CC, Edwards G, Ward SA, Park BK, McLean WG. The role of glutathione in the neurotoxicity of artemisinin derivatives in vitro. *Biochem Pharmacol*: 2001; Feb 15;61(4): 409-16.

31. Fishwick J, Edwards G, Ward SA, McLean WG. Morphological and immunocytochemical effects of dihydroartemisinin on differentiating NB2a neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*: 1998; Jun 19(3): 393-403.
32. Lau K, McLean WG, Williams DP, Howard CV. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicol Sci.*: 2006; 90 (1): 178-87.
33. Budni J, Romero A, Molz S, Martín-de-Saavedra MD. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience*: 2011; 190: 346-53.
34. Sul D, Kim HS, Cho EK, Lee M, Kim HS. Neurotoxicity in neuroblastoma cells is caused by increased oxidative stress, intracellular calcium levels, and tau phosphorylation. *Toxicology*: 2009; 8: 65-71.
35. Schelman WR, Andres RD, Sipe KJ, Kang E, Weyhenmeyer JA. Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res Mol Brain Res.*: 2004; 28: 160-9.
36. Bruhwiler J, Chleide E, Liégeois JF, Carreer F. *Neurosci Biobehav Rev.*: 1993; 17: 373-84.
37. Moncada S, Erusalimsky JD. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 2002; 3: 214-20.
38. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. *Hypertension*: 1992 ; 20 :298-303.
39. Olken NM, Osawa Y, Marletta MA. *Biochemistry*: 1994; 13: 14784-91.
40. Cosentino F, Katusić ZS. *Stroke*: 1994; 25 : 904-8. Review
41. Pufahl RA, Marletta MA. *Biochem Biophys Res Commun*: 1993; 193: 963-70.
42. Kerr RA. *Science*: 2005; 23: 309.

43. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. *Am J Surg Pathol.*: 1997; 21: 88-101.
44. Majno G, Joris I. *Am J Pathol.*: 1995; 146: 3-15.
45. Schwartzman RA, Cidlowski JA. *Endocr Rev.*:1993; 14: 133-51.
46. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT. *Toxicol Appl Pharmacol.*: 1996; 139: 122-7
47. Cohen SD. *CMAJ.*: 1993; 148: 1676.
48. Moslen MT, Balakumaran A. *Am J Hypertens.*: 1996; 9: 1144
49. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. *Int Rev Cytol.*:1980; 68: 251-306. Review
50. Robertson JD, Gogvadze V, Kropotov A, Vakifahmetoglu H, Zhivotovsky B, Orrenius S. *EMBO Rep.*: 2004; 5: 643-8.
51. Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G, Zhivotovsky B, Fiers W, Grooten J, Declercq W, Vandenabeele P. *Cell Death Differ.*: 2001 ;8: 829-40.
52. Krysko DV, Vanden Berghe T, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P. *Methods Enzymol.*: 2008; 442: 307-41.
53. Kennea NL, Stratou C, Naparus A, Fisk NM, Mehmet H. *Cell Death Differ.*: 2005 ; 12: 1439-41.
54. Scorrano L. *Cell Death Differ.*: 2003; 10: 1287-9.
55. Ashkenazi A, Dixit VM. *Science.*:1998; 281: 1305-8
56. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. *J Biol Chem.*: 2002; 277: 445-54.
57. Miramar MD. *J Biol Chem.*: 2001; 276: 16391-8.
58. Zha J. *Cell.*: 1996; 87: 619-28
59. Luo X. *Cell.*: 1998; 94: 481-90

60. Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N, Bonni A. *Mol Cell.*: 2002; 9: 1001-16
61. Putchá GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM. *Neuron.*: 2001; 29: 615-28
62. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, Reuveny E, Gross A. *J Biol Chem.*:2002; 277: 12237-45.
63. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. *FEBS Lett.*: 2001; 509: 435-8
64. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. *Science.*: 2002; 297: 259-63
65. Bouchier-Hayes L, Muñoz-Pinedo C, Connell S, Green DR. *Methods.*: 2008; 44: 222-8
66. See 1 article in 1998 by Bray SE: 1998;16: 248-60
67. Clem RJ, Robson M, Miller LK. *J Virol.*:1994; 68: 6759-62
68. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. *Immunity.*:1997; 7: 831-6
69. Eren E, Yilmaz N, Pence S, Kocoglu H, Göksu S, Kocabaş R, Kadayifci S.: 2002; 45: 155-60
70. Muppidi J, Porter M, Siegel RM. *Curr Protoc Immunol.*: 2004; Chapter 3: Unit 3.17
71. Galluzzi L, Joza N, Tasmir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G. *Cell Death Differ.*:2008; 15: 1113-23.
72. Ahadian FM: Pulsed radiofrequency neurotomy: advances in pain medicine. *Curr Pain Headache Rep*: 2004; 8: 34-40
73. Guerts JWM, van Wijk RM, Wynne HJ, et al.: Radio-frequency lesioning of dorsal root ganglia for chronic lumbosacral radicular pain. *Lancet*: 2003; 361: 21-26

74. Van Kleef M, Spaans F. The effects of producing a radiofrequency lesion adjacent to the dorsal root ganglion in patients with thoracic segmental pain by radiofrequency percutaneous partial rhizotomy. *Clin J Pain*: 1995; 11: 325-332
75. Van Suijlekom JA, van Kleef M, Barendse G: Radio-frequency cervical zygapophyseal joint neurotomy for cervicogenic headache. A prospective study in 15 patients. *Funct Neurol* 1998; 13: 297-303
76. Letcher F. S., Goldring S., The effect of radiofrequency current and heat on peripheral nerve action potential in the cat. *J Neurosurg*: 1968; 29: 42- 47.
77. Smith H. P., Mc Worther J. M., Challa V.R. Radiofrequency neurolysis in a clinical model. *J Neurosurg*: 1981; 55:346-5
78. Kanpolat Y, Onol B. Experimental percutaneous approach to the trigeminal ganglion in dogs with histopathological evaluation of radiofrequency lesions. *Acta Neurochir Suppl* 1980; 30: 363–6.
79. De Louw A. J. A., Vles H. S. H., Freling G., et al. The morphological effects of a radio frequency lesion adjacent to the dorsal root ganglion an experimental study in the goat. *European Journal of Pain*: 2001; 5:1-6
80. Higuchi Y., Nashold BS Jr., Sluijter M., et al. Exposure of the dorsal root ganglion in rats to pulsed radiofrequency energy activates dorsal horn lamina 1 and 2 neurons. *Neurosurgery*: 2002; 50:850-5
81. Erdine S, Yucel A, Cimen A, Aydin S, Sav A, Bilir A. Effects of pulsed versus conventional radiofrequency current on rabbit dorsal root ganglion morphology. *Eur J Pain*: 2005; 9: 251–256

82. Podhajsky RJ, Sekiguchi Y, Kikuchi S, et al. The histologic effects of pulsed and continuous radiofrequency lesions at 42 degrees C to rat dorsal root ganglion and sciatic nerve. *Spine*: 2005; 30: 1008-1013
83. Erdine S, Bilir A, Cosman ER, Cosman ER Jr. Ultrastructural changes in axons following exposure to pulsed radiofrequency fields. *Pain Pract*: 2009; 9: 407–417
84. Tun K, Cemil B, Gurcay AG, Kaptanoglu E, Sargon MF, Tekdemir I, Comert A, Kanpolat Y. Ultrastructural evaluation of Pulsed Radiofrequency and Conventional Radiofrequency lesions in rat sciatic nerve. *Surg Neurol*: 2009; 72: 496–500.
85. Heavner JE, Boswell MV, Racz GB. A comparison of pulsed radiofrequency and continuous radiofrequency on thermocoagulation of egg white in vitro. *Pain Physician*: 2006; 9: 135-137