

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ İLE TEDAVİ EDİLEN HİPOKSİK
İSKEMİK ENSEFALOPATİLİ SIÇANLARDA GYRUS
DENTATUS'UN STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HÜSEYİN BAYLAN**

**DANIŞMAN
PROF.DR. ESAT ADIGÜZEL**

DENİZLİ-2013

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ İLE TEDAVİ EDİLEN HİPOKSİK
İSKEMİK ENSEFALOPATİLİ SIÇANLARDA GYRUS
DENTATUS'UN STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HÜSEYİN BAYLAN**

**DANIŞMAN
PROF.DR. ESAT ADIGÜZEL**

**Bu tez TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma
Projelerini Destekleme Projeleri kapsamında gerçekleştirilmiştir
(Proje No: 108S157, Adıgüzel E, 2008-2012)**

DENİZLİ-2013

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Esat Adıgüzel danışmanlığında Dr. Hüseyin Baylan tarafından yapılan “Üzüm çekirdeği özütü ile tedavi edilen hipoksik iskemik ensefalopatili sıçanlarda gyrus dentatus’un stereolojik olarak incelenmesi” başlıklı tez çalışması 29 Mayıs 2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof. Dr. Esat Adıgüzel

ÜYE : Prof. Dr. Ilgaz Akdoğan

ÜYE : Doç. Dr. Mehmet Bülent Özdemir

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

29 Mayıs 2013
Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı
Prof. Dr. Mustafa Kılıç

Teşekkür Sayfası

Değerli katkılarından dolayı başta tez danışmanım Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Esat Adıgüzel olmak üzere, Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.İlgaz Akdoğan'a Sayın Doç.Dr. Mehmet Bülent Özdemir'e, Yard. Doç.Dr Şahika Pınar Akyer'e, emek ve katkılarından dolayı Uz. Dr. Şule Onur'a, Yard.Doç.Dr Gökşin Nilüfer Yonguç'a , Araş.Gör. Ayşegül Güngör'e ve Deneysel Araştırma Biriminde görevli Veteriner Hekim Barbaros Şahin'e ve Tekniker Zuhal Güçlü'ye, asistan arkadaşlarıma, Pamukkale Üniversitesinde sağlık alanında eğitim gören tüm öğrenci arkadaşlarıma ve bu tezin gerçekleştirilmesinde maddi kaynağı sağlayan **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu**'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY.....	XIV
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
NÖRAL GELİŞİM.....	3
GYRUS DENTATUS.....	4
FORMATIO HIPPOCAMPALIS.....	5
HIPPOCAMPUS.....	5
HIPPOCAMPUS'UN BAĞLANTILARI.....	6
GYRUS DENTATUS'TA NÖROGENEZ.....	7
SIÇAN BEYNİNDE YAPILAN ARAŞTIRMALARDA KULLANILAN BAZI BELİRTEÇLER.....	9
HAFIZA.....	9
HÜCRELERİN DIŞ ETKENLERE KARŞI TEMEL ADAPTASYONLARI.....	10
HÜCRE ÖLÜMÜ.....	10
Apoptoz.....	11
Nekroz ve Tipleri.....	12
GERİ DÖNÜŞLÜ ZEDELLENME.....	14
Hücre Zedelenmesi Yapan Başlıca Nedenler.....	14
Hücre Zedelenmesinde Hücre İçi Olaylar.....	15
HİPOKSİ – İSKEMİ.....	16
YENİDOĞANLARDA HİPOKSİK-İSKEMİK BEYİN HASARI.....	17
Asfiksi.....	17
Hipoksik İskemik Beyin Ensefalopati.....	18
İskemi-reperfüzyon Hasarı.....	19
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ.....	20

ANTİOKSİDANLAR.....	21
ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ.....	22
Üzümün İçeriği	22
Proantosyanidinlerin Etkileri	23
Polifenollerin Biyokimyası ve Farmakolojisi.....	24
ÜÇÖ'nün Etkileri	25
ÜÇÖ'nün Beyne Etkisi.....	25
Antioksidan Maddelerin Buldukları Besinler.....	26
Antioksidan Maddelerin Biyoyararlanımı	26
DENEY SIÇANLARI.....	27
MORRİS SU TANKI TESTİ (MWM).....	29
STEREOLOJİK YÖNTEMLER.....	31
GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ.....	33
SIÇANLARIN SEÇİMİ.....	33
YENİDOĞAN SIÇANLARDA HİE MODELİNİN UYGULANMASI.....	34
ÖĞRENME TESTLERİNİN UYGULANMASI.....	35
MORRİS SU TANKI TESTİ'NİN UYGULANMASI.....	35
PERFÜZYON, DEKAPİTASYON, KRANYOTOMİ VE DONDURMA-KESME İŞLEMLERİNİN UYGULANMASI.....	37
KESİTLERİN HAZIRLANMASI VE BOYANMASI.....	38
OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI.....	40
İSTATİSTİK.....	42
BULGULAR.....	44
ÖĞRENME TESTLERİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR.....	44
Morris Su Tankı Testi (Water Maze) Bulguları.....	44
BEYİN AĞIRLIĞI AÇISINDAN GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI.....	47
TOPLAM NÖRON SAYISI BULGULARI.....	49
TARTIŞMA.....	53
SONUÇLAR.....	60
KAYNAKLAR.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

a.	arteria
ALT	alanin amino transferaz
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat
AÖÖ	Alan örnekleme oranı
AST	Aspartat amino transferaz
BBDP	Biobreeding diabetes prone
CA	Cornu ammonis
CA1	Cornu ammonis 1 bölgesi
CA2	Cornu ammonis 2 bölgesi
CA3	Cornu ammonis 3 bölgesi
EC	Entorhinal cortex
ER	Endoplazmik retikulum
EGF	Epidermal growth factor
EPO	Eritropoietin
F344	Fischer 344 rat
FDA	Food and drug administration
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
Gb	Güneybatı kadranı
GD	Gyrus dentatus
Gd	Güneydoğu kadranı
γ-GGT	Gama glutamil transferaz
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
h	Disektör yüksekliği
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HİE	Hipoksik iskemik ensefalopati
HOCl	Hipoklorik asit
h_{ort}	Ortalama disektör yüksekliği
IFN-γ	İnterferon gama
IL-1	interlökin-1
IL-3	interlökin-3
IL-6	interlökin-6

KA	Kainik asit
KaÖÖ	Kalınlık örnekleme oranı
Kb	Kuzeybatı kadranı
Kd	Kuzeydoğu kadranı
KeÖÖ	Kesit örnekleme oranı
L.	Latince
LDH	Laktik asit dehidrogenaz
LÜÇÖ	Liyofilize üzüm çekirdeği özütü
MPT	Mitochondrial permeability transition
MWM	Morris su tankı testi / Morris Water Maze
N	Sayısal yoğunluk
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PB	Phosphate buffer
PDGF	Platelet derived growth factor
PEG	Poli etilen glikol
PGF2	Prostaglandin F2
PGI2	Prostaglandin I2
PUFA	Poliunsaturated fatty acid
QA	Quisquanic asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
Rb	Retinablastom
SCB	Subkallosal bölge
SGT	Subgranüler tabaka
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SOD	Süperoksit dismutaz
SSS	Santral sinir sistemi
SVB	Subventriküler bölge
t	Kesit kalınlığı
TGF-1	Transforming Growth Factor- 1
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
tnn	Total neuron number

tns	Toplam nöron sayısı
t_{ort}	Ortalama kesit kalınlığı
TrkA	Tirozin kinaz reseptörü-A
TxA2	Tromboksan A2
ÜÇÖ	Üzüm çekirdeği özütü
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XO	Ksantin oksidaz
YD	Yenidoğan
ΣQ	Toplam disektör partikül sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Formatio hippocampalis'in koronal kesiti.....	7
Şekil 2: Genel anestezi altındaki sıçan yavrusuna sol a.carotis communis ligasyonunun uygulanması.....	36
Şekil 3: Su tankı testi.....	36
Şekil 4: Kat edilen mesafe.....	37
Şekil 5: Yasak kenar.....	41
Şekil 6: SHTEREOM® yazılımında hücre sayım modülünün demonstratif görüntüsü.....	42
Şekil 7: Sıçanın platforma ulaşması için geçen zaman açısından (Escape Latency, saniye) grupların karşılaştırılması.....	45
Şekil 8: Deneğin platforma ulaşması için kat ettiği yol	46
Şekil 9: Sıçan gruplarının ortalama hızı.....	46
Şekil 10: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamalarının çubuk grafik ile gösterilmesi.....	48
Şekil 11: Beyinlerdeki makroskopik değişiklikler ile ilgili resimler.....	49
Şekil 12: Dört grubun toplam nöron sayılarının karşılaştırılması.....	52
Şekil 13: İnsan ve sıçan fetüsündeki dönemsel özelliklerin karşılaştırılması.	53
Şekil 14: Beyin ağırlıkları.....	56

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: GD'ta nörogenezi etkileyen faktörler.....	9
Tablo 2: Apoptoz ve nekrozun temel farkları.....	13
Tablo 3: Pekmez atığı üzüm çekirdeklerinde fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimliliği.....	33
Tablo 4: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'nün gallik asit,kateşin ve epikateşin içerikleri.....	33
Tablo 5: DENEYİN ÇALIŞMA PLANI.....	39
Tablo 6: SHTEREOM® programı yardımı ile elde edilmiş, bir sıçana ait hücre sayımı ve toplam hücre sayısını gösterir tablo.....	43
Tablo 7: Morris su tankı testi (The Morris Water Maze) sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri tablosu.....	44
Tablo 8: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamaları.....	48
Tablo 9: Hayvanların sağ-sol toplam nöron sayısı (tns) farkları.....	51
Tablo 10: Gruplar arası p değeri.....	51
Tablo 11: Grupların toplam nöron sayısı ortalamaları.....	52

ÖZET

Üzüm çekirdeği özütü ile tedavi edilen hipoksik iskemik ensefalopatili sıçanlarda gyrus dentatusun stereolojik olarak incelenmesi

Dr. Hüseyin BAYLAN

Bu çalışmanın amaçları hem perinatal dönemin mortalite ve morbidite insidansı yüksek bir sorun olan hipoksik-iskemik ensefalopati sonucu gyrus dentatus'ta meydana gelen hücre sayısı değişikliklerini saptamak hem de liyofilize üzüm çekirdeği özütünün antioksidan koruyuculuğunun bu hücre sayısı değişikliği üzerine yaptığı etkiyi incelemektir.

Çalışmamızda liyofilize üzüm çekirdekleri bir üzüm türü olan *vitis vinifera* cinsi üzümünden elde edildi. Deneyde Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar beşerli dört gruba ayrıldı: Birinci gruba (HİE+ÜÇÖ) hipoksi ve iskemi uygulanmasının yanında liyofilize üzüm çekirdeği tatbik edildi (subkutanöz enjeksiyon), 2. gruba (ÜÇÖ) sadece üzüm çekirdeği özütü tatbik edildi, 3. gruba (kontrol) yalancı operasyon yapıldı, son olarak 4. gruba (HİE) ise sadece hipoksi-iskemi yapıldı. Hipoksik iskemi, modifiye Levin modeline göre uygulandı. Sıçanların öğrenme ve bellek fonksiyonları Morris su tankı testiyle ölçüldü. Sakrifikasyon sonrası çıkartılan beyinlerde stereolojik yöntemlerle gyrus dentatus granüler hücre tabakasında granüler hücre sayımı yapıldı ve toplam granüler hücre sayısı hesaplandı.

Vücut ve beyin ağırlıkları açısından en düşük ortalama 1.grupta, en yüksek ise 3. grupta olarak saptandı ($p<0,05$). Morris su tankı testi sonuçlarına göre zaman ve yol açısından birinci grubun performansı diğerlerine göre düşüktü. İstatistiksel olarak zaman açısından 1.-2. ve 1.-3. gruplar arasında, yol açısından ise sadece 1.-2. gruplar arasında anlamlı fark bulundu. Hız açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı. Gyruş dentatus'da bulunan toplam granüler hücre sayıları karşılaştırıldığında en düşük hücre sayısı ortalaması 1.grupta, en yüksek ise 2. grupta saptandı. Fakat gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Morris su tankı testinde 1. grup ile 2. ve 3. grupların performansları zaman açısından karşılaştırıldığında üzüm çekirdeği özütü aleyhine anlamlı bir fark bulunduğu ve 4. grup ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark saptanmadığından liyofilize üzüm çekirdeği özütünün hipoksik-iskemik beyin hasarına bağlı oluşan öğrenme ve bellek yetersizliğini değiştirmediği sonucuna

varıldı. Gyrus dentatus'da toplam granüler n6ron sayılarının sonuçlarına g6re 6z6m çekirdeği 6z6t6n6n hipoksik iskemik sıçanlarda h6cre sayısı 6zerine anlamlı bir etkiye sahip olmadığı saptandı.

Anahtar kelimeler: gyrus dentatus, sıçan, hipoksik iskemik ensefalopati, Morris su tankı testi, 6ęrenme bellek, stereoloji, 6z6m çekirdeği 6z6t6

SUMMARY

Stereological Investigation of dentate gyrus in hypoxic ischaemic encephalopathic rats treated with grape seed extract

Dr. Hüseyin BAYLAN

The aims of this study are both to detect the changes of cell count that take place in dentate gyrus due to hypoxic ischaemic encephalopathy which is a problem of perinatal period that has high incidence of mortality and morbidity, and to investigate the effect of antioxidant protection of lyophilized grape seed extract on this cell count change.

In our study lyophilized grape seed is obtained from the grape species *Vitis vinifera*. In the experiment wistar albino rats were used. Rats were separated into four groups that contain 5 animals in each. Lyophilized grape seed administered to group 1 (HIE+UCO) subcutaneously in addition to treating with hypoxia and ischaemia, group 2 (UCO) had only grape seed administration, group 3 (control) had sham operation, lastly group 4 (HIE) had only hypoxia-ischaemia. Hypoxic ischaemia was treated according to the modified Levin model. The learning and memory function of rats were tested via Morris Water Maze. The brains were removed after sacrifice. Granule cells counting was done in the granule cell layer of dentate gyrus stereologically and total cell number was calculated.

In terms of body and brain weights the lowest mean was detected in group 1, and the highest one was of group 3 ($p < 0,05$). According to the results of Morris Water Maze the performance of the first group was lower than those of the others in terms of escape latency and path length. Difference statistically was found only between group 1 and 2 and between groups 1 and 3 in terms of escape latency, in terms of path length difference statistically significant was only found between groups 1 and 2. There was no difference significant among groups in terms of velocity. In comparison of the total granule cell counts in gyrus dentatus among groups, the lowest cell count mean was detected in group 1, and the highest one in group 2. But there was no difference statistically significant among groups in terms of total neuron numbers.

Because of finding a significant difference against grape seed extract in comparison of the Morris Water Maze Test performances of group 1 with the groups 2 and 3, but no significant difference among groups 1 and 4, it is concluded that lyophilized grape seed extract could not change learning and memory impairment due to hypoxic-ischaemic brain injury. According to the results of total granular neuron number counts of gyrus dentatus, it is detected that grape seed extract doesn't have significant effect on cell count in hypoxic ischaemic rats.

Key words: gyrus dentatus, rat, hypoxic ischaemic encephalopathy, Morris water maze, learning and memory, stereology, grape seed extract

GİRİŞ VE AMAÇ

Perinatal serebral hipoksik-iskemi; serebral palsi, mental retardasyon, öğrenme bozukluğu ve epilepsi gibi kronik durumların sık bir sebebidir. Vaktinde doğmuş yenidoğanların 2-4/1000'ü, doğum esnasında veya doğumdan kısa bir süre önce asfiksi yaşarlar. Hipoksik-iskemik ensefalopati gösteren bu asfiktik yenidoğanların yaklaşık %15 ten %20'ye kadarı yenidoğan sürecinde ölüyor, hayatta kalanların %25'i kalıcı nöro-psikiyatrik sekeller sergiler (1). Hipoksik-iskemik beyin hasarı süreci patolojinin sebebi esnasında başlayan ve resüsitasyon sonrası iyileşme periyodunda da devam eden, gelişen bir süreçtir (1). HİE'de (hipoksik-iskemik ensefalopati) glutamat toksisitesi önemli etmenlerdendir. Hücre ölümü, nekroz ve apopitoz olmak üzere başlıca iki türdür (2).

Gyrus dentatus (GD) hafıza ve anıların şekillenmesinde, depresyon patolojisinde etkili ve eksitatör nöronları bolca içermesi nedeniyle epilepside de önemli bir beyin bölgesidir. Yetişkin beyinde nörogeneze sahip yerlerden biri olması nedeniyle hipoksi-iskemi modellerinde araştırılması tercih edilen yerlerdendir.

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) oluşturan farklı patolojik durumlarda tedavi edici yeni yöntemler üretebilmek ve mevcut yöntemlerin geliştirilebilmesi için farklı deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Araştırılan patolojilerin biyokimyasal mekanizmaları ve bu mekanizmaları etkileyen etken maddelerin farklı etkileri hakkında sürekli araştırma şarttır.

Hücre ölümünü engelleyen temel mekanizmalardan biri de antioksidan yollardır. Üzüm çekirdeği özütü (ÜÇÖ); içerdiği bazı maddelerle nöron harabiyetine yol açan oksidan mekanizmaları önlemesi sayesinde antioksidan özellik göstermektedir. Bir grup polifenolik bioflavonoid olan proantosyanidinlerin serbest oksijen radikallerine karşı biyolojik, farmakolojik ve kemoprotektif özellikleri olduğu bildirilmiştir (3). Özellikle oligomerik proantosyanidin'in Vitamin E den 20, Vitamin C den 50 kat güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (3). Hipoksi öncesi yüksek doz ÜÇÖ verilmesi normalde glutamat tarafından başlatılan Ca^{2+} artışını önemli derecede azaltır (4). Ca^{2+} 'un hücre içinde aşırı birikmesi de hücreyi öldüren temel mekanizmalardan olduğu için ÜÇÖ üzerinde araştırma yapılmalıdır.

GD, formatio hippocampalis içinde bir alt bölge olup hippocampustan farklı özelliklere sahiptir. Nörogenez yapan hücrelerden zengindir ve hipoksiden daha az etkilenen bir bölgedir. Hipoksik-iskemik ensefalopati modeli uygulanan yenidoğan

sıçanlarda önceden ÜÇÖ verilenlerin GD'lerindeki nöron sayısı değişikliklerinin ÜÇÖ verilmeyen yenidoğan sıçanlara göre farklı olacağını düşünüyoruz.

Bu çalışma; hipoksi-iskemi uygulanmış neonatal sıçanlarda, oksidatif stres sonucu davranış testi sonuçlarında meydana gelecek değişikliklerin Morris Water Maze testi ile, gyrus dentatus granüler hücre sayılarında meydana gelecek değişikliklerin histolojik ve stereolojik yöntemlerle saptanarak, üzüm çekirdeği özütünün bu değişiklikler üzerine etkisini araştırmak üzere planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

NÖRAL GELİŞİM

Bir organizma zigot denen tek bir hücreden çoğalmış ve farklılaşmış, özel işlev ve boyutlar sergileyen farklı hücrelerden oluşur. Bu hücrelerden olan nöronlar özel işlevlerinin yanında akson ve dendritlerinin uzunluğu açısından diğerlerinden farklıdır. Nöronlar sinaps yapacağı eşlerini seçerler. İnsan beyni ortalama 10^{11} 'den fazla nöron içermektedir (5). Embriyonun birbirine farklı uzaklıktaki birçok noktasında, birbiriyle bağlantısız sinir yapıları oluşur. Sinir sistemi bileşenlerinin organizmadaki ilişkili olduğu yapılarla bağlantısı embriyogenez boyunca devam eden bir süreçtir.

Merkezi sinir sistemine ait nöronlar ve glial hücreler, nöral tüpü oluşturmak için kıvrılan ektodermin bir bölümünden köken alır. Nöronlar gliaların sağladığı kapalı ve korunaklı bir ortamda işlev görür. Bu yüzden glial hücreler her zaman nöronlarla birlikte oluşmalıdır.

Gelişim açısından sinir sistemi üç evreye ayrılır (5).

Evre 1: Sinir hücreleri oluşur. Hücreler kendi yerel mekanizmalarına bağlı olarak uyarıcı sinyaller ve gen düzenleyici mekanizmalarla farklı sinir bileşenlerine dönüşürler.

Evre 2: Oluşmuş sinir bileşenleri akson ve dendritlerini uzatarak geçici bir düzenli ağ kurarlar böylece sistemin ayrı bölümleri arasında bağlantı sağlanır.

Evre 3: Erişkinlikte de devam eden bu evrede birbirine uzak bileşenler arasında elektrik sinyallerinin akışına ve gücüne bağlı olarak ince ayarlar düzenlenir.

Gelişim esnasındaki tipik bir nöron bağlantı kurmak için aksonunu uzatarak sinyal gönderir. Başka nöronların aksonlarından gelen sinyalleri ise nispeten daha kısa olan uzantıları, birkaç adet dendrit ile almaya çalışır. Sinyal alamamış veya yetersiz almış nöronlar apoptoza uğrarken güçlü sinyaller alan nöronlar yaşamaya devam eder (6). Gelişen nöronlar ince yapılı akson ve dendritlerini büyüme konileri denen yapılar sayesinde uzatabilir. Bu uzantılar N-CAM ve N-kaderin gibi zar glikoproteinlerini barındıran büyüme konileri, destek glial hücreler ve kas hücreleri tarafından sürüklenir (7). Matriks proteinlerinden laminin aksonları uzatır. Büyüme konileri hedefe ulaşırsa genellikle aksondan dendritle sinaps yaparak işlevini tamamlar. Hedefe ulaşmış konilerin genellikle yarım fazlası ölür (5). Sinir hücresinin büyüme ve sağ kalımını hedef dokularca salınan bazı nörotrofik etmenler denetler. Bunların en bilineni NGF ve onun reseptörü TrkA'dır (8). Nörotrofik

etmenlerin yetersizliği hücreleri apoptoza götürür (6). Aksine yeterli NGF üretimi sonucu duysal ve sempatik sinirlerin fizyolojik apoptozu azalır. NGF veya reseptörü olan TrkA genlerinde mutasyon oluşturulan farelerin nerdeyse tüm sempatik nöronları ve NGF bağımlı duyu nöronlarının oluşamadığı gözlenmiştir (6). NGF ve akrabalarının yerel etkileri de vardır. NGF zarar görmüş bölgelerde sinir iletiminin oluşumunu uyarır (9).

Erişkin memeli beyni ve omuriliği kendini çok kısıtlı da olsa onarabilir (5). Hatta beynin bazı bölgelerinde ölen hücreler yerini sürekli yeni nöronlara bırakır. Bu bölgelerin kendini yenileyebilme yetenekleri sahip oldukları nöral kök hücrelerine bağılıdır. Suhonen ve arkadaşlarının yaptığı deneyde kemirgenin hippocampusundan alınmış kök hücreler aynı kemirgenin bulbus olfactorius'unun öncül yolağına aşılınmış ve farklılaşma anatomik bölgenin işlevine uygun şekilde gerçekleşerek yeni bir bulbus olfactorius oluşmuştur (10). Suhonen'in çalışması (10) ve benzeri çalışmalar merkezi sinir sisteminde oluşmuş hasar ve hastalıklarda nöral kök hücrelerinin kullanılabilmesi üzerine yapılan araştırmaları derinleştirmek gerektiğini düşündürmektedir.

Gyrus Dentatus

Gyrus dentatus yeni anıların oluşturulduğu bir bölgedir. Ayrıca hippocampus ile beraberce archicortexi oluştururlar (11). GD, gyrus hippocampi (gyrus parahippocampalis) ile hippocampus arasında bulunan dar ve ince bir gri cevher yapısıdır. Arkada corpus callosum'un splenium bölümünün yakınına kadar fimbria hippocampi ile beraber uzanır. GD, önce gyrus fasciolaris daha sonra ise indusium griseum olarak devam eder. Indusium griseum corpus callosum'un üst yüzünü örten ince bir gri cevher yapısıdır. indiseum griseum'un üst yüzünde 2 adet stria longitudinalis lateralis arasında 1 adet stria longitudinalis medialis denen ince beyaz cevher şeritleri bulunur. GD, ön tarafta ise uncus'un çentiğine girer ve medialde Giacomini'nin bandı ile birleşir (11).

GD bir istasyon vazifesi görür. Birçok kortikal merkezden gelen uyarılar entorinal korteks (EC) yolu ile GD'ye gelip hippocampus'a iletilir (12).

GD içten dışa doğru şöyle tabakalanır. 1: Moleküler, 2: Granüler, 3: Polimorfik tabakalar (11). Bu tabakalardan granüler tabaka en belirgindir ve içerdii granüler hücrelerin aksonları hippocampus'un CA3 alt bölgesine uzanır. Bu hücreler daha çok internöronlara ulaşır ama aynı zamanda piramidal nöronlara da gider.

Bunlar GD'nin ana uyarıcı nöronlarıdır. Perforan yollar da denen GD'nin temel afferentleri EC'nin 2. tabakasından kaynaklanır. GD diğer kortikal yapılardan girdi almaz. Bu perforan yolak EC'de oluşum sırasına göre medial ve lateral olarak ikiye ayrılır. Medial perforan yolak granüler hücrelerin proksimal dendritik alanlarıyla, lateral yolak ise aynı hücrelerin distalleriyle sinaps yapar (13). Granüler tabaka, hippocampus'taki piramidal hücrelerin dendritlerinde sonlanan aksonların çıktığı, sıkıca bir araya gelmiş, yuvarlak ve oval nöronlardan oluşur. Birkaç akson fimbria hippocampi'ye katılır ve fornix'e girer. GD, EC'den gelen afferentlerdeki bilginin CA3'te depolanmasını kolaylaştırır ve böylece hafızadaki eski bilgiler işleme esnasında korunarak yeni bilgiye adapte olur (14). GD medial temporal lobda EC'nin 2. ve 3. tabakalarıyla kendi moleküler tabakasına uzanan perforan yollarla uyarılar alır. Bu yolun aksonları GD'nin moleküler tabakasının 2/3'lük dış tarafında, granüler hücrelerinin dendritlerinde sonlanır. Schaffer kollateralleri GD'nin CA1 piramidal hücreleri ile temas kurarak hippocampus'a bilgi akışında bulunduğu yollardır. CA1 bölgesi EC'ye projekte olan subikular kompleks ile yoğun bağlantı kurar (15).

Formatio hippocampalis

Formatio hippocampalis lobus limbicus'un içinde bulunan; hippocampus, GD, subiculum, alveus, fimbria hippocampi, indusium griseum, fornix ve septal bölge (primitif prekomissural alan)'den oluşan bir yapıdır (15). Filogenetik olarak beyin en eski bölümüdür (11). Bazı kaynaklara göre gyrus parahippocampalis bu yapıyı sarmalayan bir bölgedir, bazı kaynaklarda ise bu bütünlüğün içindedir (12,16). Neocortex'e göre daha primitif bir yapıdır (12). Formatio hippocampalis ve lobus limbicus beraberce rhinencephalon (koku beyni) olarak da adlandırılır. Indusium griseum corpus callosum'un üstündeki gri maddedir, gyrus supracallosum olarak da isimlendirilir (12,16).

Hippocampus

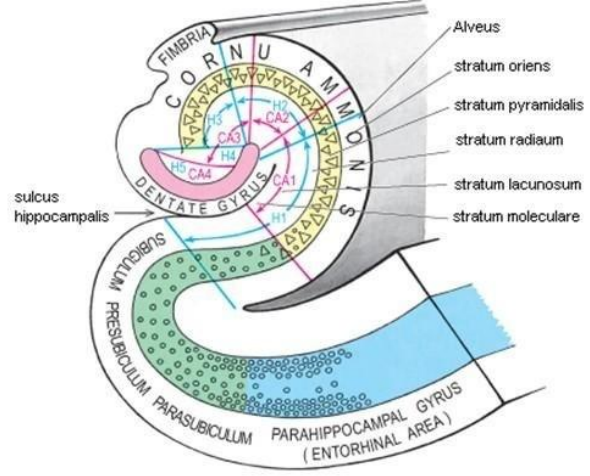
Limbik sistemin bir parçasıdır ve beyindeki birçok bölgeyle ilişkisi vardır. Limbik sistem genel olarak öğrenme, bellek, içgüdü ve emosyonel davranışlarda görev alır. Hippocampus her türlü duyuşal uyarıdan etkinleşir ve davranışlarımızı limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller göndererek etkiler (16,17). Yaşamsal görevi; yeni bilgileri depolayıp, kısa süreli belleği uzun süreli hale getirmektir (12). GD ve hippocampus beraberce archicortex çatısı altında kabul edilir (11).

Hippocampus cornu temporale ventriculi lateralis'in tabanında ortalama 5 cm uzunluğundaki bir yapıdır. Ön kısmı geniştir ve pes hippocampi olarak adlandırılan ayak benzeri bir çıkıntıya sahiptir. Ayağın digitationes hippocampi denen 3-4 adet yuvarlak çıkıntısı bulunur. Dışbükey yüzü lateral ventrikülün alt duvarındadır. İçbükey yüzü ise hemisferin alt yüzüne doğru yönelmiştir. Alt yüzde sulcus hippocampi denen yarık şeklinde bir açıklık vardır. Hippocampus'un ventrikül boşluğundaki yüzü alveus denen ince bir myelinli beyaz cevher tabakası ile örtülüdür. Alveus hippocampus'ta bulunan sinir hücrelerinin aksonlarıdır. Bu lifler hippocampus'un medial kenarına doğru toplanıp fimbria hippocampi'yi oluşturur. Fimbria hippocampi arkada crus fornicis olarak devam eder. Hippocampus arkada corpus callosum'un splenium kısmının altında son bulur (11,12,16). Gelişimin erken evrelerinde hippocampus beynin dış yapısının bir kısmını oluşturacak şekilde anteriorda yer alırken gelişmiş beyinde inferior ve medial kısma yerleşmiş olur (12). Hippocampusun koronal kesiti C harfine veya denizataına benzetilebilir. Hippocampus Latince denizataı demektir. Hippocampus'a cornu ammonis (CA) de denilmektedir. Bu yüzden bölümleri CA1, CA2 ve CA3 olarak da tariflenir. Hippocampus histolojik olarak 3 tabakalı bir oluşumdur. Dışta sinir lifleri ve dağınık küçük nöronlardan oluşan moleküler tabaka, ortada çok sayıda büyük piramidal nöronlardan oluşan piramidal tabaka, içte ise korteksin diğer kısımlarındaki polimorf tabakanın yapısına benzeyen polimorf tabakadır (11.12.16). Hippocampusun yapısı koronal kesit olarak Şekil 1 de görülmektedir (15).

Hippocampus'un bağlantıları

Gyrus cinguli'den başlayan lifler, nuclei septales'den başlayan ve fornix içinde arkaya geçen lifler, indusium griseum'dan başlayan lifler (stria longitudinalis medialis ve lateralis içinde arkaya geçerek), entorhinal alan ve koku korteksinden başlayan lifler, GD ve gyrus parahippocampalis'ten başlayan lifler hippocampus'a afferent bağlantı verirler. Ayrıca commissura hippocampi iki hemisferi birleştirir. Efferent bağlantıları ise hippocampus'un uzantıları alveus ve fimbrialar ile başlar. Fimbria, crus fornicis olarak devam eder. Sağ ve sol hemisferdeki crus'lar corpus fornicis'i oluşturacak şekilde birleşir. Corpus fornicis foramen Monroe'nun önünde aşağı ve öne doğru kıvrılan iki columna fornicis'e ayrılır. Fornix formatio hippocampalis'ten diensefalona ve septal alana uzanan çift yönlü bir yoldur. Ortalama 2,7 milyon lif içeren fornix'in bir kısım lifleri commissura anterior'un önünden, bir kısmı da arkasından geçer (11). Commissura anterior'un arkasından

geçenler nuclei anteriores thalami'de, mesencephalon'un tegmentum'unda ve corpus mamillare'ye gelip nucleus medialis'te sonlanırlarken; commissura anterior'un önünden geçenler ise nuclei septales, lateral preoptik alan ve hypothalamus'un ön bölgelerinde sonlanırlar. Stria medullaris thalami'ye katılan lifler ise nuclei habenulares'e gider. Hippocampus neokorteksin birçok bölgesinden, özellikle de temporal kısımdan bilgi alır. Kortikal bilgi perforan yollar ve alveus üzerinden sırayla gyrus prahippocampalis'teki EC'ye, GD'ye ve hippocampus'a ulaşır. GD'nin granüler hücrelerinden uzanan yosunsu liflerin aksonları CA3'teki piramidal nöronlarda sonlanırlar. Bu piramidal nöronlar fornixe yayılarak en önemli efferent yolu oluşturur. CA3 nöronları aynı zamanda CA1'e de yayılıp Schaffer kollaterallerini oluştururlar.



- Pembe : GD (Gyrus dentatus)
- Sarı : CA (Cornu ammonis)
- Yeşil : Subikuler kompleksin alanları
- Mavi : EC (Entorhinal cortex)
- CA1-3 : Hippocampus'un hücre alanları

Şekil 1: formatio hippocampalis'in koronal kesiti (15)

Limbik sistemde hippocampus'tan başlayarak fornix, corpus mamillare, tractus mamillothalamicus, thalamus'un ön çekirdekleri, gyrus cinguli, corpus callosum üzerindeki cingulum ve hippocampus yolunu izleyen liflerin oluşturduğu halkaya Papez halkası denir (11).

GD'da nörogenez

Hücre çoğalması kemirgenlerde ilk olarak GD'de gösterilmiştir. Granüler hücre tabakası yosunsu liflerin yeniden düzenlenmesi sayesinde yaşam boyunca devam eden nörogeneze sahiptir (18). GD'nin bu özelliği yetişkin kemirgenlerde gösterilmiştir (19). Subgranüler tabaka (SGT), granüler hücre tabakası ile GD'nin hilus bölgesi arasında bulunur. Yetişkin sıçanda nöronal prekürsörler SGT'de bulunur ki bu yer bu hücrelerin çoğalıp granüler tabakaya göç yaptığı yerdir (20). Göçtükleri yerde granüler hücre morfolojisini geliştirirler (19), farklılaşmış nöronların belirteçlerini üretirler (21) ve aksonal çıkıntılarını postsinaptik hedeflere uzatırlar (22). Yeni üretilen GD granüler hücreleri hilus (CA4) ve GD'nin iç moleküler tabakasında ektopik olarak da bulunmuştur (18). Yeni oluşan granüler hücrelerinin,

aksonlarını hem CA3 piramidal hücre tabakasına, hem de GD'nin iç-moleküler tabakasına gönderdiği gösterilmiştir (18). Hippocampus'ta perforan yolak uyarıldığında SGT'da mitotik aktivite artar (18). Yetişkin beyinde subventriküler bölge (SVB) ve GD'de bulunanlar hariç birçok kök hücre benzeri hücre sessizdir ve bu hücreler kök hücreler gibi kendilerini yenileyemezler. Bunlara progenitor hücreler denir ve normal hücreden daha hızlı bölünebilen mitotik hücrelerdir (14). Yetişkin sıçanlar 9400 bölünen hücreye sahiptir ve bir hücrenin bölünme hızı yaklaşık 25 saattir. Bu hıza göre günde 9.000 ve ayda 250.000 den fazla yeni hücre üretilebilir (23). Bir ayda üretilen yeni hücrelerin oranı tüm granül hücreleri içinde %6'dır (23). Afferent ve efferent popülasyonun ise %30-60'ı arasındadır (24). Kemirgenlerden insanlara kadar memelilerin GD'lerinde yeni granül hücreleri yetişkinlik boyunca üretilir (25). Nörogenez vasküler takviyenin olduğu şartlar altında oluşur (14). Endotel hücreleri, trofik faktörler yoluyla, kök hücre benzeri hücrelerin kendini yenilemelerinde, yaşamsal bir düzenleyici katkı sağlamaktadır (14). Hem SVB'de hem de GD'de kök hücre benzeri hücreler çoğalır, göç eder ve çoğunlukla granüler hücrelere farklanır. Yaşlarına bağlı olarak genç yetişkin sıçanlarda bu nörogenez SVB'de günde yaklaşık 30.000, GD'de ise 3.000-9.000 arasında yeni nöron doğumudur (14).

Rb ve E2F protein ailesi yetişkin beynin proliferatif ve postmitotik hücrelerinde ekprese edilirler (14). GD ve SVB'de Rb immunreaktivitesi çoğalan nöronal prekürsörlerde yüksektir ve terminal farklanmada düşer (26). Nörogenezi etkileyen bir başka madde ise hormonlardan kortikosteron'dur. Kortikosteron sekresyonunun baskılanması GD'de glial ve nöronal çoğalmayı artırırken SVB'deki mitotik aktivite değişmez (14). GD'yi etkileyen faktörler tablo 1'de özetlenmiştir.

Bir beyin bir yandan sinapslarını koruyarak yaşamsal davranışlarını devam ettirirken bir yandan da çevresel değişkenlere uymak için yeni sinapslar oluşturmalıdır. Bu mekanizmalar beyinde stabilite ve plastisite olarak adlandırılır (14). Plastisiteyi oluşturan yapısal değişiklikler dendritlerde, aksonlarda ve dentritik uzantılarda olur (14,27). Yeni bilgi depolanmasının dendritlerin kompleksliğinde, yoğunluğunda ve ilgili beyin bölgelerindeki hücrelerin sayısındaki artışlar sayesinde olduğu gösterilmiştir (27).

Adrenal steroidler ve eksitatuar amino asitler GD'nin granüler hücrelerinin devam eden nörogenezini akut stres durumunda baskılayabilir. Ayrıca stres ve glukokortikoidler, CA3'ün stratum lucidum bölgesindeki presinaptik yosunsu lif sonlanmalarının morfolojisini değiştirir (28). Yetişkinde, yeni oluşan immatür

nöronların granüler tabakada olgunlaşması öğrenme ve belleğe önemli katkı yapar (29).

Tablo 1: GD'de nörogenezi etkileyen faktörler

Arttırıcı yönde etkileyenler	Azaltıcı yönde etkileyenler
✓ Enrichment (30)	✓ Yaşlanma- çevresel stres (34,43,44)
✓ Handling (31)	✓ Adrenal stroidler, NMDA (36,45)
✓ iskemi (32,33)	✓ Beyin travması (46)
✓ NMDA antagonistleri, (MK-801) (34)	✓ Kronik düşük seviyeli Pb maruziyeti (47)
✓ Östrojen (35)	✓ Ketamin (48)
✓ Serotonin (36)	
✓ Egzersiz (37,38)	
✓ Nörotrofin (37)	
✓ Epileptik nöbet (14,39,40)	
✓ FGF (37,41)	
✓ Lokal IGF-1 (42)	

Sıçan Beyninde Yapılan Araştırmalarda Kullanılan bazı Belirteçler

Bromodeoksiuridin (BrdU) yetişkin nörogenezini ispatlayan, yaygın kullanılan bir S-fazı belirteci ve timidin analogudur (22, 25). Sıçanda NCAM-H (neural cell adhesion molecule) GD'nin yeni üretilmiş granüler hücrelerinde geçici olarak üretilir (19). Calbindin-D28k tüm GD granüler hücrelerinde ve CA1 ve CA2'nin piramidal hücrelerinde üretilen bir kalsiyum bağlayan proteindir (40). TUNEL apoptotik hücreleri yakalayan bir yöntemdir (49). GFAP ise astroglia belirteci olarak kullanılır (50). Ayrıca NeuN, NSE, NRI ve calbindin-D matür nöron belirteçleridir (20,51). İmmatür nöronlar ise TOAD-64 ile boyanır (52).

HAFIZA

Anı hatırlama, en fazla 60 dakika olan kısa süreli hafıza ve birkaç günden fazla süren uzun süreli hafıza olarak üç tip hafıza işlemi vardır (12).

Kısa süreli hafızayı uzun süreli hafızaya dönüştürmede, hippocampus önemli rol oynar. Bilateral hippocampus hasarı meydana gelen hastada anterograd

amnezi gelişir. Forniksi bilateral etkilenen hastada ise hafıza depolanamaz hale gelir.

Uzun süreli hafızadan temporal bölge sorumludur. Formatio hippocampalis epizodik ve uzaysal öğrenmede görevli beyin yapısıdır. Hippocampus'ta büzülme genellikle deklaratif, epizodik, uzaysal ve ilişkilendirilmiş (contextual) hafızalarda bozukluklarla beraberlik gösterir. Korkuyla ilgili öğrenme ve hafızada, amigdala ve GD arasındaki ilişki sorumludur. Sıçanlara geçici stres yapıldığında, adrenal steroidler ve eksitatuar amino asitler sadece hippocampus'un CA3 bölgesindeki apikal dendritlerini etkilerse uzaysal ve kısa dönem hafızada yetersizlikler ortaya çıkar (27).

HÜCRELERİN DIŞ ETKENLERE KARŞI TEMEL ADAPTASYONLARI

Hücreler canlılıklarının devamı için, iç dengeleri olan homeostazı sağlamak zorundadır. Dış etkenler bazen fizyolojik streslere ve bazı patolojik sonuçlara neden olur. Hücrelerin canlılığı hücrel adaptasyon kavramı altında bazı uyum süreçleri sayesinde korunur. Adaptasyon hiperplazi, hipertrofi ve atrofi olarak üç şekilde sonuçlanabilir ve her üçü de fizyolojik veya patolojik olabilir.

Bir dokudaki hücre sayısının artmasına hiperplazi denir. Örneğin yara iyileşmesinde fibroblastlar ve kan damarları hiperplaziye uğrar.

Dokudaki hücrelerin boyutlarının artmasına hipertrofi denir. Dokudaki hücrelerin sayı ve işlevlerinin azalması ise atrofi olarak isimlendirilir.

İleri yaşlarda ortaya çıkan ateroskleroz nedeniyle beyin kanlanmasının azalması ilerleyici hücre yitimi oluşturarak ilerleyici beyin atrofisi yapar. Hücre canlılığını sürdürebildiği daha küçük bir boyuttadır (53). Atrofinin etiyolojisinde artan protein yıkımı suçlanır. Daha az mitokondri, daha az ER ile bir homeostaza sahiptir. Atrofik hücre de zedelenme, nekroz veya apoptoz yaşayabilir.

Cushing sendromu, post-travmatik stres sendromu, tekrarlayan depresyon, yaşlanma demansı, Alzheimer hastalığı gibi durumlarda formatio hippocampalis atrofiye uğrar. Bu atrofi glukokortikoidler, eksitatuar amino asitler ve NMDA reseptörleri yoluyla oluşur. NMDA reseptör blokajı stresle başlayan dendritik atrofiyi önlemede etkindir (27).

HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücrelerin iskemide kaldıkları süre hücrenin nekroz veya apoptoza girme riskiyle doğru orantılıdır. Hücre iskemisinin kısa sürede kalkması hücreyi ölmekten

korur. Her hücre tipi için bu süre farklıdır. Sinir ve kalp hücreleri hassas iken diğer hücreler daha dayanıklıdır.

Ölümlle sonuçlanan zedelenme geri dönüşsüz (irreversibl) zedelenme olarak isimlendirilir. Geri dönüşsüz zedelenmede mitokondrilerde şekilsiz yoğunlaşmalar, vakuolizasyonlar, membranlarda işlevsel kayıplar gözlenir. Geri dönüşsüz zedelenme geçirmiş hücre, nekroz veya apoptoz mekanizmalarından birini etkinleştirir. Her iki hücre ölüm yolağı etkinlendiği faktörler açısından birbirleriyle ilişkilidir. MPT'nin (mitochondrial permeability transition) kısa süreli veya uzun süreli açık kalması, oksidatif stres, hücrenin ATP içeriği, Bcl-2 seviyesi gibi farklı faktörler zedelenmiş bir hücreyi iki yoldan herhangi birine sürükleyebilir. MPT zedelenme esnasında mitokondri iç membranında oluşan yüksek iletimli bir kanaldır (54).

Apoptoz

Apoptoz zedelenmiş bir hücrenin, kendi mekanizmalarını ekstrinsik (ölüm reseptörü-TNF) veya intrinsik (mitokondrial) başlatıcılar ile etkinleştirmesiyle; kontrollü ve programlı intiharıdır (55,56). Apoptoz; inme gibi beyin hasarlarında, büyüme faktörlerinin eksilmesinde, epilepsilerde gerçekleşen bir mekanizmadır (56,57). Nörodejeneratif hastalıklarda da apoptoz türlü genlerle etkinleşir (58). Zedelenmiş bir hücrede ATP azalmışsa hücre ölümü, nekroz ile oluşur. Çünkü apoptoz için ATP'ye ihtiyaç vardır (59-61). Apoptoz bazı genler ile düzenlenir ve kaspazlar denen sistein proteazlar aracılığıyla hücre içinde gerçekleşir (62-64). Apoptozda Bcl-2 protein süper ailesi içerdiği 20 farklı protein ile etkilidir (56,65). Bu proteinlerin bir kısmı apoptozu başlatır, bir kısmı ise baskılayıcı özellik gösterir. Örneğin aynı protein ailesinin üyelerinden olan Bcl-2 ve Bcl-x apoptozu baskımlarken, Bax apoptozu indükler (66). Apoptoz ile ilgili genlere başka bir örnek ise Rb (retinoblastom) genidir. Rb geni kaybında aşırı apoptozis oluşur (67). Hücre içi kalsiyum düzeyi de etkilidir apoptozda (68). Apoptozda giren hücreler apoptotik cisimler haline gelir ve çevre hücre ve makrofajlarca fagosite edilerek, çevre doku yapılarına zarar vermeden uzaklaştırılır (56). Apoptozdaki hücreler fagositozlarını kolaylaştırmak için K,Cl gibi iyonlarını ve organik ozmolitlerini dışarı pompalar, hücre iskeletini kasar ve böylece boyutlarını düşürür.

Apoptoz hücre zedelenmesi oluşturan patolojik durumlar olmadan da gerçekleşebilir.

Fizyolojik apoptoz olarak adlandırılmış bu durum özellikle embriyogenezde etkindir. Embriyogenez sürecinde ölmesi gereken hücrelerin apoptozda girmemeleri organizmaya sonradan türlü zararlar getirebilir. Bir hücrenin nükleer DNA'sının

onarılmayacak düzeyde zedelenip etkilenmesi hücreyi apoptoza sokan yolları başlatır. Bu duruma patolojik apoptoz denir. Limbik lob epilepsisinde GD'de hem apoptotik hücre ölümü hem de hücre proliferasyonu görülür (69,70).

Nekroz ve tipleri

Daima patolojik sayılan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekroza giren hücreler şişer, proteinler denatüre olur, organeller yıkılır. Apoptozdaki gibi tek hücrenin değil birçok hücrenin etkilenmesi organizmada işlev kaybı yaratır (71). Nekrozun ışık mikroskopunda fark edilmesi hücre ölümünden ancak 4-12 saat sonradır. Yani ölümden hemen sonra formaline alınan hücreler ölüdür fakat patoloji terimlerine göre nekrotik değildir. İskemik hücrede pH düşer, asit hidrolazlar etkinleşir ve böylece sitoplazmik ve nükleer komponentler parçalanır. Membranların ağır zedelenmesi, lizozomal enzimlerin sitoplâzmaya çıkıp kendi içinde bulunduğu hücreyi sindirmelerine neden olur. Otoliz denen bu olay sonucu hücre içeriği dışarı çıkarak nekroz oluşur. Dışarı çıkan enzimler çevre doku yapılarına da zarar verir. Klinikte bunlar biokimyasal belirteç olarak kullanılır. Nekrozdaki eozinofili; RNA'nın sitoplâzmadaki bazofilinin kaybından veya denatüre proteinlere eozinin daha çok bağlanmasından oluşur. Vakuollü görünüm enzimler organelleri sindirdiği için oluşabilir. Yaygın fosfolipid kitleleri myelin figürleri oluşturur nekrozda. Başka hücrelerce sindirilen bu yapılar yağ asitlerine dönüştürülür ve ortamdaki kalsiyum ile birleşip dokularda sabunlar oluşabilir. DNAaz aktivitesi karyolizis yaparak kromatin bazofilisini soluklaştırır. DNA'nın sıkılaştığı durumlarda ise apoptozda da görülen piknoz adını verdiğimiz çekirdek büzülmesi ve bazofilisi oluşabilir. Nekrotik hücrelerde 1-2 gün sonra karyoreksis olarak tanımlanan çekirdek parçalanması gerçekleşir ve nükleus ortadan tamamen kalkar (71).

Nekrozlar morfolojilerine göre beş tiptir:

1: Koagülatif nekroz: Beyin dışındaki tüm dokularda hipoksiye bağlı hücre ölümü karakteristik olarak koagülatif nekroz yapar. Nekrotik doku hücreyi sindirecek enzimler de hasarlandığı için uzun süre yapısını korur. Ortamdaki artık yapıyı ortama gelen lökositlerin lizozomal enzimleri sindirir (74).

2: Gangrenöz nekroz: Cerrahi uygulamada bir uzvun kanlanmasının kesildiği durumlarda uzuvda oluşan koagülatif nekroza gangrenöz nekroz denir. Uzvun amputasyonuna yol açabilir (75). Gangren bölgesine bakteriyel infeksiyon eklendiğinde, bakteriler ve ortama gelen lökositler sonucu oluşan likefaktif nekroz, gangrenöz nekroz ile bütünleşip yağ gangren olarak isimlendirilir (76,77).

3: Kazeöz nekroz: Koagülatif nekrozun ayrı bir paterni olan kazeöz (peynirsi) nekroz, en sık akciğer tüberkülozunda oluşur. Kazeöz nekrozun nekroz alanında beyaz, peynire benzer bir görünüm vardır (53,78,79).

4: Likefaktif nekroz: Bakteri ve mantar enfeksiyonları vücuda yerleştiğinde inflamatuvar hücreleri uyarır. İnflamatuvar hücreler ortamda birikince likefaktif nekroz oluşur. Merkezi sinir sisteminde hipoksik zedelenme karakteristik olarak diğer dokuların aksine koagülatif nekroz yapmaz, likefaktif nekroz oluşturur (80,81). Oluşmuş likefaksiyonda doku yapışkan bir sıvı kitlesine dönüşür çünkü ölü hücreler tamamen sindirilir. Ortamda bulunan ölü lökositler oluşan bu püyün sarı-krem rengine katkıda bulunur (53).

5:Yağ nekrozu: Yağ dokusundan zengin bölgelerde oluşan patolojilerde oluşur. Bu alanlarda etkinleşmiş lipazların aktivitesi sonucu yağ yıkım ürünleri yoğunca bulunur. Örnek olarak akut pankreatitte etkinleşmiş pankreatik lipazlar, pankreas parankimine ve etraf yağ dokulara zarar vererek ürünlerini periton boşluğunda biriktirir. Yağ hücre membranlarının trigliserid esterleri parçalanır. Serbestleşmiş yağ asitleri kalsiyum ile birleşir ve çıplak gözle seçilebilen tebeşirimsi beyaz alanlar (yağ sabunlaşması) oluşur (82-84).

Tablo 2: Apoptoz ve nekrozun temel farkları

<i>Apoptoz (72,73)</i>	<i>Nekroz (71,73)</i>
1 Tek hücreyi etkiler	Komşu hücreleri de etkiler
2 İnflamatuvar yanıt oluşmaz	Belirgin inflamatuvar yanıt oluşur
3 Hücre büzülür	Hücre şişer
4 Hücre tomurcuklanır fakat hücre bütünlüğü korunur	Membran bütünlüğü kaybolur
5 Mitokondrial membran geçirgenliği artar, proapoptotik proteinlerin salınımı ve apoptotik cisimlerin oluşumu artar	Organeller şişer ve lizozomal sızıntı oluşur
6 Kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu düzenli oluşur	DNA çözünmesi rastgele olur
7 Apoptotik cisimler komşu hücrelerce sindirilir	Çözünmüş hücreler makrofajlarca sindirilir

GERİ DÖNÜŞLÜ ZEDELLENME

Zedelenen her hücre ölüme gitmez. Ölüm ile sonuçlanmayan, hücrelerin yaşamaya devam ettiği zedelenme, geri dönüşlü (reversibl) zedelenme olarak adlandırılır. Geri dönüşlü zedelenmede ultrastrüktürel olarak hücreler arası bağlantılar gevşer, myelin figürleri oluşur, plazma membranları küntleşir, kabarcıklar oluşur, mitokondrilerde fosfolipidden zengin şekilsiz yoğunlaşmalar oluşur, polizomlar kopar ve ER'de dilatasyonlar oluşur. Geri dönüşlü zedelenme ışık mikroskopunda hücresel şişme veya yağlı değişiklik varlığıyla saptanır. Yağlı değişiklik irili ufaklı lipid vakuollerinin sitoplâzmadaki görülmesidir. Yağlı değişiklik en çok kalp kası, hepatosit gibi yağ metabolizmasının etkin olduğu hücrelerde, ayrıca hipoksik, toksik veya metabolik zedelenmelerin çeşitli biçimlerinde görülür. Hücresel şişme ise oksidatif fosforilasyonun türlü sebeplerle azalması sonucu oluşan ATP yetersizliğinin, hücre zarındaki iyon hareketlerine enerji açısından yetemediği durumlarda hücre içine aşırı su girmesi sonucu oluşur. Geri dönüşlü zedelenmede hücrenin endoplazmik retikulumunun genişlemiş ve kopmuş bölümleri sitoplâzmadaki küçük şeffaf vakuoller yapar. Bu mikroskopik görüntüye hidropik değişiklik veya vakuoler dejenerasyon denir.

Hücre zedelenmesi yapan başlıca nedenler

Hücre zedelenmesini başlıca oksijen yoksunluğu (hipoksi), fiziksel ajanlar, kimyasal ajanlar ve ilaçlar, infeksiyöz etkenler, immünolojik reaksiyonlar, genetik bozukluklar ve beslenme dengesizlikleri gibi etkenler yapar (54, 85). Travma, aşırı sıcak, aşırı soğuk, atmosfer basıncındaki ani değişimler ve elektrik şoku vb etkenler hücreyi zedeleyen fiziksel ajanlar grubunda sayılır. Arsenik, siyanid (siyanür), civa tuzları vb. kimyasal ajanların çok küçük miktarları hücreleri öldürebilirken, glukoz, tuz, oksijen gibi esansiyel maddelerin aşırı miktarları zedelenmeye sebep olabilir (85). Çevre ve havayı kirleten maddeler, insektisidler, herbisidler, karbon monoksit, asbest, alkol ve her türlü tedavi edici ilaç hücre zedelenmesi yapabilir. Virüs, bakteri, mantar, parazit gibi infeksiyöz etkenler canlılardaki klinik bulguları hücre zedelenmesi yaparak oluşturur. Vücuda yabancı olan maddelere karşı vücut immünolojik reaksiyonlar gösterir. Bazı organizmalarda gelişimsel nedenlerle vücudun kendi bileşenleri de yabancı kabul edilip otoimmün reaksiyonlar gelişebilir. Bağışıklık sisteminin hücresel ve sıvısal elemanları seçilmiş veya rastgele hedeflerde hücre zedelenmeleri yapabilir (86). Bazı genetik bozuklukların varlığı hücreyi zedeleyici ajanların zedeleyici etkilerini geri çeviren mekanizmaların

çalışmasında yetersizliklere neden olabilir. Bu yüzden genetik bozukluğa sahip hücreler zedeleyici etkenlere daha hassastırlar. Örnek olarak defektif bir hemoglobin olan hem-S, içinde bulunduğu eritrositlerin ömürlerinin azalmasına yol açar. Son olarak protein-kalori eksiklikleri, farklı vitamin eksiklikleri, gereğinden fazla alınan lipidler vb. beslenme dengesizlikleri hücre zedelenmesi yapan etkenler arasında sayılabilir (53).

Hücre zedelenmesinde hücre içi olaylar

Membran transportu, protein üretimi, lipogenez, fosfolipid döngüsü vb. hücre canlılığının devamında etkili süreçler, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin kullanıldığı enerji metabolizmalarına bağımlıdır. O₂ kullanarak mitokondrielerde ADP'nin oksidatif fosforilasyonu (aerobik yol) ve O₂ yokluğunda ise kandaki glikoz veya hücre içi depolardaki glikojenin hidroliziyle (glikolitik yol) sitozolde üretilen ATP, hücrelerin temel yüksek enerjili fosfat bileşiğidir. Bu bileşik normalin altına indiğinde plazma membranındaki ATP bağımlı Na⁺-K⁺-ATPaz pompasının etkinliği azaldığı için Na hücre içinde birikirken K hücre dışına dağılır (87). Böylece hücre içine su girip hücre şişer ve ER genişler (88).

Ayrıca iskemide O₂ ve glukozdan yoksun kalan hücrelerin protein sentezi sürecinde katlanmamış protein yanıtının oluşması da zedelenmeye katkı yapar (89). Mitokondri ve lizozom membranlarındaki hasarlar protein sentezi azaldığı için tamir edilemez ve hasar geri dönüşsüz hale gelip hücreyi ölüm yollarına götürür. Mitokondri ger dönüşsüz hasarda anahtar rollerden birini bu yüzden oynar. Hipoksi-iskemide nöronların mitokondrieleri dilüe olur ve kristallerinden ayrılırlar (90). Mitokondri iç membranında MPT denen yüksek iletimli bir kanal oluşması da zedelenme yapar (54). Bu kanalın kısa süreli oluşması geri dönüşümlü zedelenme yaparken, zedeleyici ajanın uzun süreli varlığında mitokondrial potansiyel bozulup yeterli ATP oluşmadığı için geri dönüşsüz zedelenme oluşur. Ayrıca iç ve dış mitokondrial membranların arasında bulunan sitokrom-c, ATP varlığında sitozol içine sızarak apoptozu etkinleştirir (61).

Beyin iskemisinde aşırı glutamat salınışı glutamat toksisitesine yol açar. Glutamat nöronlarda intrasellüler Ca²⁺ derişimini iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerini aktive ederek artırır (91,92,93). Nörotoksitate başlıca aşırı intrasellüler Ca²⁺ derişimi yükselmesi ve peşi sıra nöronal hücre ölümüne yol açan NMDA reseptörlerine bağlıdır (94). NMDA reseptör aktivitesini takiben Ca²⁺

yükselmesi NOS (nitrik oksit sentaz) 'ı uyarır. NOS nöronlarda NO oluşumunu başlatır (95). NO aynı zamanda glutamat nörotoksitesine aracılık eder (95).

Ca^{+2} , sitozolde serbest halde bulunan Ca^{+2} - Mg^{+2} -ATPaz'lar tarafından düşük seviyede tutulur (96). Hücre içinde artan Ca 'u en çok mitokondri ve ER, sonra da nükleus ve plazma membranı depolar. Post-iskemik doku hasarında artan sitozolik kalsiyum, serbest radikallerin aşırı şekilde üretilmesine sebep olur (97). Bu bilgi çeşitli kalsiyum blokerlerinin lipid peroksidasyonunu ve ROT oluşumunu önlediği araştırmalarda kanıtlanmıştır (98). Oksidatif streste oluşmuş ATP eksikliği, çalışan kalsiyum pompası sayısında da düşüşe sebep olup hücre içindeki serbest Ca^{+2} miktarını artırır. Böylece artan kalsiyum; fosfolipazları, proteazları ve endonükleazları etkinleştirir (99).

Etkinleşmiş proteazlar membranların yanında hücre iskeleti proteinlerini de yıkar. Hücre iskeleti hücre içi yapıları plazma membrana bağlayan filamanlardan oluşur. İskemik hücrede, hücre içinde patolojik olarak artan su miktarına ek olarak, filamanların proteazlar tarafından zedelenmeleri, bu ipliklerin kopmalarına katkı sağlayarak hücrenin şişmelerine neden olur.

Aktif endonükleazlar hücrenin DNA ve kromatinini parçalarlar. ATP'nin azlığı uzun sürdüğünde ribozomlar kaba ER'dan ayrılır ve polizomlar monozomlara ayrışır.

Etkinleşmiş fosfolipazlar ise membran fosfolipidlerini parçalar (90). Buradan oluşan lipid parçalanma ürünleri arasında esterleşmemiş serbest yağ asitleri, açıl karnitin ve lizofosfolipidler; membranlar üzerinde deterjan etkisi yaparak çift tabaka membranların arasına girer. Membran fosfolipidleri ile yer değiştirip, geçirgenlikte değişikliklere neden olabilir. Plazma membranı hasarlandığında proteinler, enzimler, koenzimler ve ribonükleik asitler etrafa saçılır. Organel membranlarının zedelenmesiyle de RNAaz'lar, DNAaz'lar, proteazlar, fosfatazlar, glukozidazlar ve katepsinler sitozole geçip etkinleşir ve böylece hücre nekroza gider. Böyle sonuçları bakteriyel toksinler, viral proteinler, kompleman parçaları, sitolitik lenfositler, kimyasal ve fiziksel etkenler ve kısmen indirgenmiş oksijen serbest radikalleri membranları zedeleyerek doğurabilir (90).

HİPOKSİ - İSKEMİ

Dokuya gelen arteriyel kan akımı azalması veya dokunun venöz drenajının bozulmasına iskemi denir. Kanlanmayı azaltan durum genellikle arteriyel sistemdeki tıkanıklıktan kaynaklanır. Ayrıca kan basıncının aşırı azalması veya kan kaybı da

aynı türde zedelenme yapar. Hücrenin enerji yollarından oksidatif solunum, ortamdaki yeterli oksijen miktarına bağlıdır. Hücreye varması gereken yeterli oksijen miktarındaki düşüş ise hipoksi olarak tanımlanır. İskemi, kalp-akciğer yetmezliği, anemi, karbon monoksit zehirlenmesi, alyuvar bozuklukları hipoksi yapan nedenlerdendir. Hücrenin adaptif yeteneğini aşan bu zararlı etkenler homeostaz denen iç dengeyi bozup hücre zedelenmesi adı altında bir dizi olaya neden olabilir. Klinikte en sık hipoksik-iskemik tipte hücre zedelenmesi görülür.

Hipoksinin en sık nedeni iskemidir (53). İskemi sonucunda gelişen hipokside glikoliz için gerekli substratlar bitmiştir ve böylece enerjinin anaerobik üretimi de durur. Ayrıca birikmiş metabolitlerin temizlenmesi için gerekli olan kan akımı olmadığından glikoliz de engellenir. Fakat hipoksi, izole olarak gelişirse glikoliz yolağı enerji üretmeye devam eder. Sonuç olarak iskemi dokuya hipoksiden daha zararlıdır (53).

Oksijen parsiyel basıncı dokuda 0,1 mm Hg'nın altına düşerse mitokondride NADPH ve FADH birikmeye başlar (90). ATP azalır, AMP ve ADP artar. ADP ve AMP'nin artışı anahtar düzenleyici glikolitik enzim olan fosfofruktokinazı aktifler ve oksidatif fosforilasyon sonucu glukoz başına üretilenden çok daha düşük bir miktar ATP üretilir. ATP azalması sonucu Na/K-ATPaz pompası çalışmaz, K hücre dışına, Na ve Ca hücre içine doğru yer değiştirir. Böylece hücre içinde su artarak sitotoksik ödem gelişir. Hücre içi kalsiyum birikmesi, fosfolipaz ile prostaglandinlerin (PGI₂,PGF₂,TxA₂), lökotrien ve serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olur (100).

YENİDOĞANLARDA HIPOKSİK-İSKEMİK BEYİN HASARI

Beyinde hipoksi, serebral kan akımında yetersizlik, vücutta oksijen azalması, kanın oksijen taşımada yetersizlik ve metabolik durumlarda gelişir (101). Hipoksi varlığında kalp beyne giden akımını arttırır. Devam eden hipokside serebral otogegülasyonu bozulduğu için arterioller sistem vazodilate olamaz. Hipoksi myokardı da etkileyecek kadar uzun sürerse kalp atımı da azalıp hipotansiyon oluşur (100).

Asfiksi

Perinatal asfiksi doğuma yakın bir sürede, doğum sırasında ya da doğumu izleyen dakikalarda bebeğin oksijensiz kalmasıdır (100). Asfiksi merkezi sinir sisteminde HİE, infarkt, intrakranial hemoraji, nöbetler ve serebral ödem yapabilir (102).

Ciddi asfiksi başlangıçta bilinç düşüklüğü, bilateral hemisfer disfonksiyonu, sekonder periyodik nefes alma, hipotoni ve nöbetler şeklinde yansır. 12-24 saat arasında uyanıklıkta artış gerçekleşebilir. Fakat 24 ve 72 saatler arasında nöbetler kötüleşip apne ortaya çıkabilir. 72 saat sonra hayatta kalanlar stupor, anormal tonus, emme ve çiğneme rahatsızlıklarıyla beraber beyin sapı disfonksiyonu yaşarlar (101).

Roland ve arkadaşlarına göre akut total asfiksi talamus ve beyin sapı nükleuslarına, uzamış total parsiyel asfiksi ise kortekse ve subkortikal beyaz maddeye etkir (103).

Hipoksik-iskemik ensefalopati

HİE bebeklerde morbidite ve mortalitenin ana nedenidir (100,101). Hipoksi ölü doğum, erken neonatal ölüm, HİE tablosu ve bunun sekellerine yol açabilir (100). YD HİE olgularının çoğu antepartum ve intrapartumda olur (100,101). Hipoksik-iskemik ensefalopati geçirmiş asfiktik yenidoğanların %20-50'si yenidoğan dönemlerinde ölür (90). HİE klinik olarak hafif, orta ve ciddi şeklinde 3'e ayrılır (101). Hipoksi-iskeminin uzun sürmesi beyaz madde nekrozu yapar (90). HİE'deki hücre hasarı, gelişen beyin ödemi, hipoksi, asidoz ve hipotansiyon sonucu laktat, serbest radikaller ve ekzitotoksik amino asitler gibi metabolitlerin aşırı birikiminden kaynaklanır (100,101).

Perinatal hipoksik iskemik beyin hasarında oluşan hasar nörona selektiftir, yani glialar (astrozitler, oligodendrositler) ve kan damarları korunur. İnfarkta ise nöronların yanında kan damarları ve glialar da etkilenir. Beyinde bu iki durum aynı anda oluşabilir. Akut hipoksi-iskeminin lezyonları beyaz maddenin aksonlarının göreceli olarak korunduğu erken reaktif gliozisten, enfarkta kadar değişebilir.

Reaktif gliozis, serebral hemisferin subkortikal ve periventriküler beyaz maddeleri, centrum semiovale ve corpus callosumda başta astrozitler olmak üzere gliaların proliferasyonudur ve akut hipoksi iskemi dışında ayrıca sepsis, intraüterin viral enfeksiyon ve malnütrisyon da görülür. Hipoksizde hasarlanma hassasiyeti fazladan aza doğru nöron, glia ve kan damarları olarak sıralanır. Hatta yenidoğanda bazı beyin bölgeleri hipoksiye daha duyarlıdır. Hipoksiye en duyarlı bölgeler beyin korteksinde 3.,5. ve 6. tabakalar, hippocampus'ta CA1, CA3 bölgeleri, subkortikal ve periventriküler beyaz maddeler, beyin sapında colliculus inferior ve cerebellum'da purkinje hücre tabakası olarak saptanmıştır (90).

MSS'nde glikoliz anaerobik koşullarda 5-10 kat artar (100). Beyin hasarı yapabilecek düzeyde bir hipoksi-iskemi, laktik asid birikimine bağlı doku asidozuyla

daima beraberdir. Kana karışan laktik asit metabolik asidoz oluşturur. Hipoksi-iskemi laktik asidin yanında H⁺ iyon kaynağı yoluyla da hücrel asidoz yapar. Sellüler asidoz hipoksi-iskemide nöronal nekroza katkı yapar (90).

Otuzbeş haftalıktan küçük fetüslerde beyin damar ağı oluşumu yetersizdir. Otuzbeş haftalıktan büyük fetüslerde ise cerebrum, bazal gangliyon, beyin sapı ve cerebellumda kortikal nöronlar hipoksiye daha duyarlıdır. Perinatal beyin hasarının tipi bu yüzden term bebekler ile erken doğanlar arasında farklıdır. Term yenidoğanlarda oluşan hipoksi-iskemi başlıca kortekste nöron harabiyeti (en sık parieto-okspital bölgede), parasagittal serebral hasar ve ilerde kortikal atrofi oluşturur. Parasagittal lezyonlar subkortikal beyaz maddede gelişen bilateral ve genellikle simetrik olan hasar bölgeleridir (100). Hipoksi-iskemi term yenidoğanlarda ayrıca hippocampus, bazal ganglionlara, talamusa, beyin sapına ve serebellar hemisferlere de etkir (90).Hipoksi-iskemide kan beyin bariyerlerine ROT saldırısı olur ve böylece vazojenik ödem oluşur. Ödem ciddiyetine göre nöronal ve aksonal yapıları koparabilir (90). HİE beyin kanamasına eğilim yaratır. Kanamalar term yenidoğanlarda daha sık intrakranial oluşur (100).

İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Uzun süren iskemilerde durmuş kan akımının tekrar başlaması, iskemi-reperfüzyon hasarı denen paradoksal bir durum ortaya çıkartır. İskemi-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri artar (54,104). Bu durum hücre aleyhine, geri dönüşsüz zedelenme yaratır. Bu yüzden myokardial ve serebral infarkt gibi hassas bölgelerdeki iskemilerin tedavisi iskemi-reperfüzyon hasarı düşünerek yapılmalıdır.

Reperfüzyon hücre içine yüklü miktarda kalsiyum sokar. Reperfüzyonda Ca birikimi genel olarak ROT'nin kalsiyum kullanan proteinlere doğrudan etkisiyle veya membran lipid peroksidasyonunu indükleyerek dolaylı yoldan oluşur. Reperfüzyon hasarının temel efektör hücreleri nötrofillerdir. Ortama bir anda gelen bol lökosit, endotel veya parankimal hücrelerden ortaya çıkan oksidazların aktivitesi sayesinde çok miktarda süperoksit anyonu üretir. ROT'nin bir anda aşırı üretilmeleri sonucu reperfüzyonda doku hasarı artar. Reperfüzyonda süperoksit ve hidrojen peroksit, yağ asidi ve prostoglandin metabolizmasından oluşur (90).

İskemi/reperfüzyon şartları altında ksantin dehidrogenaz substrat olarak moleküler oksijen kullanan ksantin oksidaza çevrilir. İskemi esnasında ATP tüketiminin artması pürin katabolitleri olan hipoksantin ve ksantin birikimine yol açar ki peşisıra oluşan reperfüzyon ve oksijenin hücre içine girişi ksantin oksidaz tarafından metabolize edilerek muazzam miktarlarda süperoksit radikali ve hidrojen

peroksit oluşur (90,105). ROT ile başlatılan DNA zararı tek veya çift sarmal DNA kırıklarına, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonlarına, DNA'da çapraz bağlanmalara yol açar. ROT'a ilaveten reaktif nitrojen türlerinden (RNT) peroksinitrit ve nitrojen oksitler de DNA hasarında etkilidir (98,106). ROT'nin saldırıları membran geçirgenliğinde değişikliklere, membran çift katlı lipid tabakasında bozulma ve çeşitli hücre proteinlerinde işlevsel modifikasyonlara yol açar (98).

Bazı IgM antikorları iskemik dokularda birikmeye eğilimlidir. Reperfüzyon sonucunda, kandaki komplemanların iskemik dokuda daha önceden birikmiş antikorlar ile bağlanması hücre zedelenmesini ve yangıyı artırır (86).

İskemi-reperfüzyon hasarının iskemi döneminde oksijen miktarının düşük olmasına rağmen ROT'nin üretimlerinin düşük değil, orta düzeyde olması oksijenin mitokondrial kaynaklı olmasındandır (107-109).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulunan anstabil ve reaktif moleküller olarak tanımlanırlar (110). Bu radikaller elektron bağışlarsa indirgen, elektron alırlarsa oksidandırırlar. Oksidasyon atomlar arası elektronların transferidir (111). İki ayrı radikalın birleşip radikal özelliklerini kaybetmeleri durumu haricinde oluşan bu maddeler hücreye zararlıdırlar.

Serbest oksijen radikalleri hücre içi normal biyokimyasal süreçlerde fizyolojik olarak veya inflamasyon ve reperfüzyon hasarı gibi patolojik durumlarda dokuları zedeleyebilen zararlı maddeler olarak üretilir (112-115). Diyetteki enerji alımındaki artış mitokondri kökenli serbest radikal üretimini artırıp oksidatif strese neden olur (114). NADH, NADPH ve FADH₂; protein, yağ ve glukozun aerobik metabolizmaları ile oluşur. Serbest oksijen radikalleri hemen NADH veya FADH türevli H⁺ iyonlarıyla tepkime oluşturur. Bu tepkime superoksit dismutaz varlığında hidrojen peroksit oluşturur. Fe, Cu ve NO yüksek reaktif serbest radikallerin oluşumunu başlatır (90). Başlıca ROT örnekleri şunlardır: süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil, hipoklorik asit (HOCl), peroksil, alkoksil ve hidroperoksil radikalleri (90). Nitrik oksit ve nitrojen dioksit ise oksijen türevli olmayan iki nitrojen serbest radikalidir (53).

Fizyolojik şartlarda vücudun tükettiği oksijenin yaklaşık %1-3 arası ROT'lara çevrilir (87). Böylece aerobik hayat için gerekli olan oksijenin bazı şartlarda hayatı kötü etkileyen toksik durumlar yaratması oksijen paradoksu olarak adlandırılır (110).

Serbest radikaller ve oksidatif stres konjestif kalp hastalığı, valvuler kapak hastalığı, kardiyomyopati, hipertrofi, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalığı gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde anahtar rol oynar (116).

Beyin özellikle hassastır oksidatif hasara çünkü yüksek oksijen kullanımına sahiptir ve aynı zamanda okside olmaya müsait poliansature yağ asitlerinden ve redoks-aktif metallere (Cu, Fe) zengindir. Redoks aktif metaller çeşitli serbest radikallerin oluşumunda çok etkindir (117). Serbest radikaller poliansature yağ asitlerinin hidrofobik kısımlarını hedefledikleri için membran fragmentasyonu oluşur (90).

Demirin hem Fe^{+2} (ferröz) hem de Fe^{+3} (ferrik) formu yağ asitlerinden bir hidrojen atomu çıkartıp alkoksi ve peroksi radikalleri oluşturan peroksidasyon yapmaya muktedir. Sekonder hasara demirin katkısı özellikle immatür beyinde daha fazladır. Demir hidroksil radikali oluşumundaki katalizör katkısı için Fe, ferröz forma dönmelidir. Hipoksi-iskemi sonucu ksantin oksidaz, süperoksit ve NO artar. Bu üç madde de demiri ferröz forma indirger (90).

Etkinleşmiş makrofajlar oksijen alımında artışa giderek NAD(P)H oksidaz veya myeloperoksidaz içeren reaksiyonlar tarafından süperoksit anyonu, nitrik oksit ve hidrojen peroksid üretirler (118). İnflamatuvar bir durumda hidrojen peroksidin derişimi 10–100 mM seviyesine ulaşır (98).

Fibroblastlar, damar düz kas hücreleri, kardiyak myositler ve endotel hücreleri gibi çeşitli non-fagositik hücre türleri NAD(P)H oksidaz tarafından ROT üreterek intrasellüler sinyal kaskadını düzenler (119).

Hücrelerde düşük derişimlerde ROT ortaya çıkartan endojen uyarıcı maddeler, sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar (IL-1, IL-6, IL-3, TNF- α , IFN- γ , EGF, anjiyotensin II, PDGF, VEGF, NGF, TGF-1, GM-CSF ve FGF-2 olarak sıralanabilir (98,119-123).

ANTIOKSİDANLAR

Beyin oksijen ve nitrojen radikallerine özellikle hassastır. Bu radikaller insan ve hayvanların hippocampus, serebral korteks ve diğer beyin bölgelerindeki lipid peroksidasyonuna bağlı çeşitli beyin hastalıklarında etkinlik gösterirler (124). Beyindeki etkili mekanizmalardan olan apoptoz ılımlı oksidan uyarı ile başlatılırken, nekroz yoğun oksidan etkilerle başlatılır (125,126).

Biyokimyasal mekanizmalarla ROT'ni temizlemeye çalışan antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak ayrılır.

Endojen enzimler süperoksit dismutaz (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD), glutatyon peroksidaz (GSH), glutatyon redüktaz ve peroksizomlarda bulunan katalaz'dır (53,117). Non-enzimatik olanlar ise C vitamini, E vitamini, karotenoidler, tiyol antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin, lipoik asit), flavonoidler, selenyum, melatonin olarak örneklenebilir (117,127).

A, C, E vitaminleri ve beta-karoten, proantosyanidinler, çinko ve selenyum gibi mineraller vücudun kullandığı antioksidan maddelerdir (53,117,128,129). Meyveler, sebzeler ve tohumları vitamin C, E ve beta karotenden zengin besinlerdir. Diğer bazı antioksidanlar ise şunlardır: kolesterol, arginin, sitrulin, taurin, kreatin, selenyum, çinko, polifenoller (90,114).

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ (ÜÇÖ)

Üzüm çekirdekleri şarap ve üzüm suyu endüstrisinin artık ürünleridir. Üzüm çekirdeği özütü hazırlamak için önce çekirdekler etrafındaki dokularından arındırılıp 1 hafta boyunca gölgede kurutulur. Sonra 0,4 mm'den daha ince tozlar haline gelinceye kadar öğütülür. Bu tozlar oda sıcaklığında 72 saat boyunca %75 etanol ile ıslatıp yumuşatılır. Etanol buharlaştıktan sonra geriye liyofilize toz şeklindeki ÜÇÖ kalır (130)

Uzun yıllar boyunca değişik coğrafyalarda kullanılan üzüm çekirdeği özütünün statüsü FDA tarafından GRAS (generally regarded as safe) olarak tanımlanmıştır. Tavsiye edilen dozu günde 100 ile 300 mg olarak kabul edilmiştir fakat hamile ve süt veren kadınların ÜÇÖ'nden kaçınmaları tavsiye edilir (131).

Üzümün içeriği

Bir üzüm genel olarak öz (%80–90), deri (%5–12), kök (%2–6) ve çekirdekten (% 0–5) oluşur (131). Üzümdeki bileşikler antosyaninler, stilben türevleri, polifenoller ve flavonoidler olarak sınıflanabilir.

Üzümde 3-glukozid, 3-asetilglukozid, 3-kumaroilglukozid, 3-kaffeoilglukozid, 3,5-diglukozid, 3-asetil-5-diglukozid, 3-koumaroil-5-diglukozid, 3-kaffeoil-5-diglukozid, delfinidin, peonidin, petunidin, malvidin antosyaninleri bulunur (132).

Üzümlerde stilben türevi olarak trans-resveratrol (trans-3,5,40-trihidroksi stilben) gösterilmiştir (133).

Fenoller, üzüm ve şaraplarda, karbonhidratlar ve meyve asitlerinden sonra en bol bulunan 3. içeriği oluştururlar. Polifenoller fenolik asitlerden basit veya kompleks flavonoidlere kadar değişen, geniş bir ailedir ve flavan-3-ol türevleridir.

Flavan-3-ol, kolayca oligomerik prosyandinler ve polimerik bileşiklerle kondense olur. 2 ile 5 arası monomerik flavan-3-ol'un birleşmesi oligomerik prosyandinleri oluşturur. Polimerler ise 5'ten fazla monomerin birleşmesiyle oluşur (131,134). Kateşin, epikateşin ve epikateşin-3-O-gallat monomerdirler. Dimerik prosyandinler B-serileri olarak, trimerikler ise C-serileri olarak tanımlanır. Üzüm kabuğu ve çekirdeğinden 5 farklı dimer (prosyandin B1,B2, B3, B4, B5) ve 2 farklı trimer (prosyandin C1,C2) tanımlanmıştır. Bu dimer ve trimerlere kateşin ve epikateşinler katılır. Üzüm çekirdeğinden en çok kateşin, epikateşin, prosyandin fenolik bileşikleri çıkarılır (135). Üzüm çekirdeklerinde bulunan diğer polifenoller ise gallik asit, monomerik flavan-3-ol, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin 3-o gallat, kaempferol-3-O-glukozid, quercetin-3-O glukozid, quercetin ve mirisetin, dimerik-, trimerik ve polimerik proantosyanidinler olarak sıralanabilir (136-138).

Doğal polifenollerden olan tanninler yapısal karakterlerine göre gallotanninler, ellagitanninler, kompleks tanninler ve kondense tanninler olarak 4 büyük gruba ayrılır. Oligomerik ve polimerik proantosyanidinler kondense tanninlere bağlıdır (139).

Fenoller çoklu hidroksil grupları içeren, hidrojen veren antioksidanlardır ve tekli oksijen doyurucularıdır. Bu özellik polifenolleri reduktan ajanlar grubuna sokar. Aynı zamanda çok potent metal şelatlayıcı ajanlardır. Serbest radikalleri tuzaklar, doyururlar ve zincir reaksiyonu kırarlar (135). Fenolik antioksidanlar hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO) hızlıca verir, böylece alkil (aril) peroksit oluşturarak (ROOH) lipid peroksidasyonunu inhibe eder (139).

Çıkarılabilir üzüm fenollerinin kaynağının %60-70'ini üzüm çekirdekleri oluşturur, üzüm çekirdekleri ise üzümün toplam fenol ağırlığının sadece %5-8'ini oluşturur (131,135,136). Bu fenol çıkarılabilme oranı üzümün pulpasında %10 veya daha az iken, üzüm kabuğunda ise %28-35 arasındadır (136).

Proantosyanidinlerin etkileri

Üzüm çekirdeği ve kabuğundaki ana fenolik bileşikler proantosyanidinlerdir (137). Proantosyanidinler güneş ışığından vücudu korumaya, görmeyi geliştirmeye, eklemlerde, arterlerde ve kalp gibi vücut dokularında esnekliği geliştirmeye, kapiller, arter ve venleri güçlendirerek kan dolaşımına yardım eder. Proantosyanidinlerin serbest radikalleri yakalayıp antioksidan etki yaratmalarının yanında vazodilatatör, antikarsinojenik, antiarteriyel, antiinflamatuvar, antibakteriyel, kardioprotektif, immün-stimülan, antiviral ve östrojenik etkileri de vardır. (91,116,131,140,141).

Üzüm çekirdeği proantosyanidinleri vasküler endotel superoksit üretimini vücutta ve beyinde önemli ölçüde azaltır (140).

Proantosyanidinler ayrıca fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe eder. Proantosyanidinler lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu azaltarak antioksidan savunmayı güçlendirirler (112).

Polifenollerin biyokimyası ve farmakolojisi

Flavonoidler aromatik amino asitler (fenil alanin ve tirozin) ve malonat'tan oluşmuş bitkisel maddelerdir. Flavonoidin temel yapısı 3 halkadan (C6-C3-C6) oluşmuş 15 karbonlu flavan çekirdeğidir (111). Flavonoid sınıflandırması oksidasyon seviyesine ve son halkasının davranışına göre yapılır. Önemli flavonoidler: flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3-ol ve antosyanidinlerdir. Diğerleri ise biflavon, şalkon, auron ve koumarinlerdir. Hidroliz edilebilen tanninler, proantosyanidinler (flavan-3-ol oligomerleri), kafeat ve lignanların hepsi bitkisel fenollerdir ve ayrıca sınıflanır. Flavonoidler bitkilerde genellikle glikozile formdadır (111).

Flavonoidlerin biyolojik sistemlerdeki yararlı etkileri serbest radikallerdeki elektronları transfer etmelerine, metal katalizörleri şelatlamalarına ve oksidazları inhibe etmelerine bağlıdır (142,143).

Üzüm çekirdeği polifenollerini oksijen, ışık, asit ve alkaliye çok hassastır fakat ısıya hassasiyet görece daha azdır. Proteinler fenolik bileşikler ile hidrojen bağları yoluyla geri dönüşümlü olarak birleşirken, oksidasyon yoluyla geri dönüşümsüz kovalent bileşikler yaparlar. Proantosyanidinler renksizdirler ve asit ortamda ısıtıldıklarında kırmızı renk verirler. Alkali solüsyonda ise ajanlarla reaksiyonları mavi renk oluşturur.

Sindirilmiş flavonoidlerin %30-60'ını fenolik asitler oluşturur. Diyetteki flavonoidler ilk antioksidan savunmalarını sindirim kanalında ROT oluşumunu kısıtlayarak ve onları yakalayarak gerçekleştirir (143). Fenolik bileşiklerin emilim sonrası plazma derişimi 10 µM'ı aşmaz (144).

Prosyandinin dimer ve trimerleri ince barsak epitelinden geçebilirken ortalama 7 birimli oligomerler ve daha büyük polimerik flavonoidler düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere küçültülür (145)

2 farklı üzüm türünün arasındaki etki farkının araştırıldığı bir çalışmada molekül ağırlığı düşük polifenollerin üzüm içeriğinde daha fazla olması hücre sağkalımı lehine bulunmuştur (146).

ÜÇÖ'nün etkileri

ÜÇÖ, NO oluşumunu baskılar (91). Üzüm çekirdeğinin güçlü serbest radikal yakalama yeteneğini vardır (113,147). ÜÇÖ superoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini başarılı olarak yakalar (139). Bu işi E ve C vitamininden daha iyi yapar (148). Hatta üzümdeki proantosyanidinlerin antioksidan gücü E vitamininden 20, C vitamininden ise 50 kat güçlüdür (149-151). ÜÇÖ superoksitleri yakalamada hidroksil radikallerine göre daha başarılıdır ve E vitamini ile kombine edildiğinde daha çok radikal yakalanır (152).

E ve C vitaminleri, selenyum ve karotenoidler gibi antioksidanlar arasında etkileşim vardır. Fenolikler vitaminleri erken oksidasyondan koruyup primer işlevleri için hazır hale getirir (135). Gallik asit hepatosteatoz ve oksidatif stresi inhibe eder (141).

Sonuç olarak serbest radikal yakalayan ÜÇÖ içerikleri, resveratrol, kateşin, flavonol, proantosyanidin, antosyanin ve gallik asittir.

Antioksidan özelliği bulunanlar prosyanidin ve antosyanindir.

Membran oksidasyonuna karşı koruyanlar ise resveratrol ve kateşin'dir (137). Resveratrol kardiyovasküler hastalıklara karşı protektif etkilere, antiinflamatuvar ve antikarsinojen etkilere sahiptir. Resveratrol, kan beyin bariyerini geçen bir madde olduğu için akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda korumada hem de sağaltımda yararlı olabilir (153). Fakat üzüm çekirdeği, kabuğu kadar yüksek resveratrola sahip değildir (154).

ÜÇÖ'nün beyne etkisi

Hippocampus organizmanın öğrenilmiş görevlerini geri çağırma ve serebral kortekste pekiştiren bir bölgedir. Öğrenme ve bellekte iyileşme açısından üzüm çekirdeği gibi proantosyanidinden zengin kaynaklar hippokampal hücre oluşum hızını ve nörotransmitter için oluşan reseptörlerin gelişimini artırır (124,155). Öğrenme ve bellekteki yaş ile ilişkili gerileme artmış oksidatif strese metabolik cevabın hippokampal nöronlarda değişmesine bağlıdır (124). ÜÇÖ antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, kardioprotektif, antidiabetik, nöroprotektif ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir (112,136,137). ÜÇÖ sıçanlarda kan beyin bariyerini geçebilen resveratrol ve proantosyanidinler gibi birçok madde içerir (124,153). ÜÇÖ; hücre çoğalmasına, nöroblast farklılaşmasına ve bu farklılaşan hücreleri GD'deki granüler hücrelerle bütünleştirmek lehine nörogeneze katkıda bulunur (156).

Antioksidan maddelerin buldukları besinler

İnsanlar flavonoidleri meyve, sebze, şarap, çekirdekler, kabuklu yemişler, tahıllar, baharatlar, çay, bira ve kakaodan elde eder (111,157). Bitkilerde yapraklara, tohumlara, kabuklara ve çiçeklere dağıldığı belirlenmiş 4000 in üzerinde flavonoid tanımlanmıştır (157).

Üzüm tohumunda gallik asit, (+)-kateşin, epikateşin, dimerik prosyandin ve proantosyanidin bulunur. Üzüm kabuğunda ise proantosyanidin, ellagic asit, myricetin, quercetin, kaempferol ve trans-resveratrol bulunur (137).

Proantosyanidinler de denen flavan oligomerleri elma, üzüm, yemiş ve arpada mevcuttur (111).

Antosyanidinler ve onların glikozidleri olan antosyaninler dut, kırmızı üzüm gibi meyvelerde bol bulunan doğal pigmentlerdir (111). Üzümün derisi ve tohumu arasındaki et kısmı antosyanidin içermez (137). Bu antosyanidin pigmentleri birçok sebze ve meyvenin turuncu, kırmızı, mavi ve mor renginden sorumludur. Meyve sularındaki sarı ve kahverengi görünümüne ise polifenoller ve oksijenin polifenol oksidaz ile oksidasyonu sonucu oluşur (135).

Gallik asit çilek, ananas, muz, limon, kırmızı ve beyaz şarap, mazı (yumru), sumak, çay yaprağı, meşe kabuğu ve elma kabuğunda bulunur (141,158,159).

Uzun dönem yeşil çay kullanımı kateşin ve metabolitlerinin bazal seviyede kalmasına yönelik bir garantidir (111).

Kateşin, epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat yeşil çay, kafeinsiz yeşil çay özütü ve siyah çikolata alımından sonra insan kanında tespit edilir (160).

Kateşin ve epikateşin, çikolata (161-163), siyah ve yeşil çay (164-166) ve kırmızı şarap (167,168) tüketildiğinde emilim sonrası plasma ve idrarda asıl olarak glukuronize, metilli ve sülfatlı metabolitler şeklinde bulunur (134).

Antioksidan maddelerin biyoyararlanımı

Genel olarak kateşinler lipide, prosyandinler ise suda çözünürler. Bu yüzden prosyandinleri kateşinlerden ayırmak kolaydır. Suda çözünen prosyandinlerin özleri herhangi bir organik çözücü olmadan çıkartılabilir. Su veya etanolde çözünen proantosyanidinler intestinal yoldan emilirler ve tüm dokulara ve plasmaya yayılırlar. Fakat aköz asetonda çözünüp su veya etanolde çözünmeyenlerin biyoyararlılığı azdır. Dimer, trimer ve tetramer proantosyanidinler yüksek biyoyararlılığa sahiptir.

Küçük molekülü proantosyanidinler devamlı antioksidan salarlar ve plazma ve dokularda 7-10 güne kadar kalırlar. Yüksek moleküler ağırlıklı olanlar ise polimeriktirler, emilemezler, biyoyararlılıkları yoktur fakat sindirim yolunda lipidleri, proteinleri ve karbonhidratları oksidatif zarardan korurlar.

Proantosyanidinler, kan-beyin bariyerini tokoferol gibi diğer antioksidanlardan daha kolay geçer (124).

Flavonoidler intestinal emilime uğrarlar ve periferal kan kompartmanına geçmeden önce ilk geçiş metabolizmasına uğrarlar (140). Flavonoidlerin diyetten alımı C vitamini (70mg/day), E vitamini (7-10 mg/gün), ve karotenoidlere (α -karoten, 2-3 mg/gün) göre daha yüksektir (169). Flavonoid alımı meyve ve sebzelerin tüketimine, kırmızı şarap, çay ve filtresiz bira içiminin sıklığına göre günde 50-800 mg arasında değişir (111). Özellikle kırmızı şarap ve çayda bol fenol vardır (bardak başına yaklaşık 200 mg) .Proteinlerin polifenollere bağlanması sonucu polifenollerin biyoyararlılıklarını azalır, alkol ile beraber tüketilmesi ise artırır (111). Flavonoid emilimini yağlarla beraber tüketilmesi artırır (170). Yeşil çaydaki kateşinler, üzüm çekirdeğindeki oligomerik proantosyanidinler, serbest hallerine kıyasla fosfolipidler ile kompleks halindeyken daha yüksek emilirler (170).

Prosyanidin dimer ve trimerleri ince barsak epitelinden geçebilirken, ortalama 7 birimli oligomer ve daha büyük polimerik flavonoidler düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere küçültülür (145). Sindirilmiş flavonoidlerin büyük kısmı emilmez ve intestinal mikroflora tarafından kullanılır. Bu floranın bakteriyal enzimleri hidroliz, heterosiklik oksijen içeren halkanın bozulması, dehidroksilasyon ve dekarboksilasyon gibi çeşitli reaksiyonları gerçekleştirir (111). İntestinal membrandan emilim esnasında bazı flavonoller, flavonlar, isoflavonlar ve kateşinler; glukuronid ve sülfatlarına çevrilir (171). Emilmiş flavonoidlerin bu küçük kısmı karaciğer enzimleri tarafından metabolize olup idrar ile atılabilir veya safra kesesi yoluyla duodenuma geri döner (171).

DENEY SIÇANLARI

Günümüzün laboratuvar sıçanları *Rattus norvegicus*'un (kahverengi sıçan) evcil torunlarıdır (172,173). Sıçanların taksonomisi: Animalia- Chordata- mammalia- Rodentia-Myomorpha-Muridae-Rattus-norvegicus şeklinde sıralanır (172). Albino mutantlar ilk kez 1828 yılında bir perhiz deneyi için kullanılmıştır (173).

Sıçanlar biyolojik saatleri açısından geceleri ve sabahın erken saatlerinde yaşayan canlılardır. Sıçanlar enfeksiyonlara farelerden daha dirençlidirler. Postnatal

dönemdeki ilk 15 gün beyin ve vücut ağırlıkları orantılı olarak artış gösterirken 15 günden sonra vücut ağırlığı artış oranı beyninkine nazaran artar. Laboratuvar sıçanları tipik olarak saldırgan olmayan, meraklı ve kolayca eğitilen hayvanlardır. Vahşi akrabalarına göre kalabalıkta yaşamaya daha uygundurlar. Deneylerde kullanılmaları için araştırmacıların deney öncesinde sıçanları elleriyle uygun şekilde yakalayıp kendilerini benimsetmeleri gerekir. Erkekler genellikle dişilerden daha saldırgandır. Türkçede kullanılan soy terimi İngilizcede iki çeşittir: sıçan eğer inbred ise 'strain', outbred ise 'stocs' olarak adlandırılır. İnbred aynı tür ebeveynlerden türetilmiş saflaştırılmış sıçanlardır, outbred ise melezlere denir (172).

Laboratuvar sıçanları vahşi akrabalarından bazı yönlerle farklıdır (172). Laboratuvar sıçanlarının beyinleri, karaciğerleri, böbrekleri, adrenal bezleri ve kalpleri daha küçüktür (172,173). Beyin ağırlığı 1,8/250g. iken beyin hacimleri ise 1,2 mL/250 gramdır. Cinsel olgunluğa daha erken erişirler. Üreme döngülerinde mevsimsellik yoktur ve doğurganlıkları daha iyidir. Fakat daha az ömre sahiptirler (172).

Sıçanlar puberteye ortalama 50.-60. günlerde ulaşırlar, vajinal açıklık 35.-90. günlerde, testisin inişi ise 20.-50. günlerde tamamlanır. Pubertedeki sıçanın östrus siklusu yaklaşık 4-5 gündür ve östrus periyodu yaklaşık 12 saat sürer. Gebelik süresi 21-23 gündür ve yılda 7-9 defa doğum yaparlar. Bir doğumdaki ortalama yavru adedi 4-8'dir. Yavrular 16. günden itibaren yem yemeye başlar ve ortalama süttten kesilme zamanları 21 gündür (172).

Bilim adamlarının deneylerde kullandığı çok fazla sıçan türü vardır. En sık kullanılan mutantlar Wistar, Sprague Dawley, Long-Evans, spontan hipertansif sıçan (spontaneously hypertensive rat (SHR), Lewis, BBDP (Biobreeding Diabetes Prone), Zucker ve Fischer 344 (F344) sıçanlarıdır. Sprague Dawley, Long-Evans, spontan hipertansif sıçan ve Lewis sıçanları Wistar kökenlidir (172-175).

Wistar sıçanı 1906 yılında *rattus norvegicus* türüne ait albino sıçanlardan Wistar Enstitüsünde türetilmiştir. Günümüzde en yaygın kullanılan soydur. Geniş kafası, uzun kulakları ve vücudundan daha kısa kuyruğu ile tanınır (173). Sprague Dawley sıçanı sakin, tutması kolay ve kuyruk boyları oransal olarak Wistar sıçanlarına göre daha uzun olan bir soydur. Çok amaçlı deneylerde kullanılır (173).

Long-Evans tepeleri siyah veya kahverengi olan, beyaz sıçanlardır ve sıklıkla davranış ve obezite araştırmalarında kullanılır (173). SHR sıçanlarının kan damarları adenosin, asetilkolin ve isoproterenol gibi ilaçlara wistar soylarından daha az gevşetici cevaplar verir (174).

Lewis sıçanı albino, uysal karakterli, düşük doğurganlıklı ve yüksek kanser insidansına sahip bir sıçan soyudur (173).

BBDP sıçanı otoimmün tip-1 diabeti spontan geçiren bir soydur. Tip-1 diabetin araştırıldığı hayvan modellerinde kullanılır (173).

Zucker sıçanları obezite ve hipertansiyon araştırmalarında genetik bir model olmak üzere geliştirilmişlerdir. Zayıf ve obez fenotipli iki ayrı zucker sıçanı tipi vardır (173).

F344 sıçanları kanser araştırmalarında ve toksikolojide 1920'den beri kullanılmaktadır. Bu soyda spontan yaşla ilgili neoplasmların ve dejeneratif hastalıkların insidansı yüksektir (175).

MORRIS SU TANKI TESTİ (MWM)

Morris su tankı testi sıçanlarda bilişsel eksiklikleri saptayabilir ve derecelendirebilir. Bu özelliği ile farklı değişkenlerin bilişsel sonuçlarını ölçen araştırmalarda sıkça kullanılan bir yöntemdir (176-180). Uzaysal öğrenme, yer yön bulma ve hafıza gibi yetenekler sıçanlarda Morris su tankı testiyle ölçülebilir (176,180). Bu testin bilişsel işlevi ölçmedeki geçerliliği birçok makalede desteklenmiştir (180,181). Fakat az sayıda çalışma MWM'in performansının güvenilirliğini yüzde olarak ölçmüştür (181). Bu testte başarısız sayılan sıçanlarda, yaşlarının ve beyinlerindeki zararların yanında görüş keskinliği gibi bilişsel olmayan faktörler de etkilidir (182,183). Ayrıca cinsiyet, hayvanların türleri, yaş, beslenme durumu, strese maruziyet, enfeksiyon gibi birçok faktörden de etkilenir (184). Sıçanların hippocampus, striatum, bazal önbeyin, cerebellum ve cortex cerebralis lezyonlarında MWM'de başarısızlık görülmüştür (184).

MWM'in 3 türü vardır (181).

1:referans bellek (reference memory version)

2:hareketli platform (a moving-platform repeated acquisition version),

3:işaretili platform (a cued platform version)

MWM çalışmalarını monitörize edilerek sıçanların zekâlarını 'yeterli' veya 'yetersiz' olarak sınıflayabiliriz (177,185,186).

Morris su tankı 152 cm lik çapta, 50 cm derinliğinde, içi 21°C su doldurulmuş bir dairesel havuzdur (181). Havuzun üst çeperinde kuzey, güney, doğu ve batı olarak 4 nokta belirlenir (187). Bu noktaların arasında kalan bölgeler kuzeydoğu (Kd), kuzeybatı (Kb), güneydoğu (Gd) ve güneybatı (Gb) kadrantları olarak kabul edilir (188). Su dolu havuzun içinde su yüzeyinin 1 cm altında bırakılmış 100 cm²lik

kare bir platform bulunur. Platform araştırmacı tarafından yeri değiştirilebilir ve sıçanlar tarafından görünmez olmalıdır. Bu düzeneklerin tamamı 22°C sabit sıcaklığa sahip bir odada bulunur. Geniş, yüksek çözünürlükte görsel işaretler odanın her tarafında ve havuzun duvarlarında bulunur. Sıçanların hareketlerini video formatında kaydetme düzeneği de olmalıdır.

Bazı araştırmacılar ise havuzun boyutlarında ve içeriklerinde farklılık yapmışlardır (176,183). Gage FH ve Björklund A. adlı araştırmacılar ortak bir çalışmalarında havuz boyutlarını 140 cm çaplı ve 45 cm derinliğinde ayarlamışlardır. Ayrıca opaklık vermek amaçlı 0,5 litre süt tozu havuz içindeki suyla karıştırılmıştır (176).

Sıçanları denemeler yaptırarak MWM'e alıştırmak gerekir. Başarılı bir denemede farklı 4 noktadan su içine bırakılan bir sıçan yüzerek en fazla 120 saniye içinde gizli platformun üstüne çıkabilmelidir. Başarılı sıçanlar ve bu azami süre (120 sn) içinde platformu bulamamış başarısız sıçanlar 15 sn boyunca platformun üstünde bekletilir. Ortama bu şekilde alıştırılan sıçanlara 7 gün boyunca MWM testi uygulanır. Hareketli platform testinde her denemede platformlar rastgele yerlere konur. Morris su tankı testinin başka bir işleminde işaretler kullanılır. Bu işleminde platform üzerine yüksek çözünürlükte 88 cm²'lik görsel bir işaret konur. Bu görevde sıçanın yüzme mesafesi ve platformu bulmaya çalışırken kat ettiği yolun uzunluğu monitorize edilir ve böylece sıçanın bilişsel işlevi ölçülür. Bu test sıçanları bilişsel olarak 'yeterli' veya 'yetersiz' olarak sınıflar (186).

Her sıçan aynı yerden ve aynı yönde bırakılmalıdır havuza. Hipotermiyi engellemek için sıçanlar son denemelerinden sonra 38.5°C'lik suyu bulunan banyoya 5 dk boyunca konur ve ardından da 15 dk boyunca infrared ısıtıcı ile ısıtılarak kafeslerine götürülebilir (189). Sıçanların azami süre içinde platformu bulamadığı denemelerde yüzme mesafesi üzerinde yüzme hızının etkisini kaldırmak için, platformun bulunamadığı denemelerdeki mesafelerin medianı alınır (189). Yüzme mesafesi MWM'de bilişsel işlevi ölçen en iyi parametredir (181). MWM'de yüzme hızlarını ölçerek motor işlev de ölçülür (189). Akinetik, ağırlığı düşük ayakta duramayan ve su içinde başını kaldıramayan sıçanlar çalışmaya katılmamalıdır. (182). Yüzme hızları yaşlar ile ters orantı gösterir. Yüzme hızları ve yüzme mesafeleri de ters orantılıdır.

Morris su tankı testi dışında sıçanlarda kullanılan başka düzenekler de vardır. Y su tankı (Y water maze) sıçanları davranışsal olarak test eder. Bu düzende sıçanı yüzmeye zorlayacak 18°C su bulunur ve 2 ayrı kola da konabilen

sıçanın tırmanabileceği bir platform bulunur. Test tamamen karanlık bir ortamda yapılır (190).

STEREOLOJİK YÖNTEMLER

Bu yöntemler gerçekte 3 boyutlu olan fakat insan gözüyle iki boyutlu algılanan görüntüler üzerinde partiküller sayılarak yorum yapılmaya çalışılan bilimsel çalışmaların sonuçlarını gerçeğe yaklaştıran son yüzyıl içinde bulunmuş yöntemlerdir (191,192). Bu yöntemlerle laboratuvar ortamında 2 boyutlu kesitlerdeki cisimlerin hacimleri, yüzey alanları, sayıları, uzunlukları ve bu verilerden türevlenebilecek daha başka verilere ulaşılabilir (193). Örneğin vücudumuzdaki damarların toplam uzunluğu, ince barsakların yüzey alanları bu yöntemler ile bulunabilir.

Disektör yönteminin stereolojik yöntemlere eklenmesiyle mikroskopik analizlerde sonuçların güvenilirlik ve yansızlık özellikleri artmıştır. Bu yöntemlerde kullanılan sistematik rastgele örnekleme ilkesine göre örneklemin ilk safhasındaki rastgele bir sayı seçilir. Ardından ikinci temel kural olarak değiştirmeyeceğimiz başka bir sayı belirlenir ve örneklem bu aralıklarla kurallı olarak yapılır (23,194). Her bölgeye eşit örneklem şansını vermek, tarafsızlık ilkesini korur. Analiz sonuçlarının bilimsel kabul edilmesi bu yöntemin tüm kesitlerde eksiksiz uygulanmasına bağlıdır.

Bu yöntem Gundersen isimli bir araştırmacı ile kısmen geliştirilmiştir. Bindokuzyüzdoksanbir'de West ve arkadaşları optik disektör yöntemiyle sistematik örnekleme ve optik parçalama yöntemini birleştirmiştir (195). Böylece bu yöntem nörobilimde yıllardır etkili ve tarafsızlık ilkesini sağlayan bir yöntem haline gelmiştir.

Gundersen stereolojiye tarafsız sayım çerçevesi ve sayım kuralını getirmiştir. Mikroskopta incelenen bir kesitin görüntü alanına bütün halde giremeyen yapıların sayılıp sayılmayacağı belirsizliği yok olup çift sayılma yanlışı engellenmiştir. Görüntüsü izlenen bölgede görüntüden daha küçük ve sabit bir dörtgenin sol ve alt kenarlarına değen objeler yasak kenarlara değdikleri kabul edilip sayım dışı bırakılırlar (Bkz. Şekil 5). Serbest kenarlar denen dörtgenin sağ ve üst kenarına temas eden tüm objeler ise çerçeve içinde kabul edilip sayıma dâhil edilir. Ayrıca bu kesit üzerinde z eksenini boyunca ilerleme yöntemiyle sanal bir küp oluşturabiliriz. İşte bu optik disektör yöntemidir (191).

Fiziksel disektör ayrı bir stereolojik yöntemdir. Belli mesafelerde birbirine paralel alınan kesitlerde birbirini izdüşüm olarak takip eden parçalar sayılmaya çalışılır. Kesitlerin kalınlığı, sayılması planlanan partikül türlerinin ortalama vertikal uzunluklarının üçte biri uzunluğunda olmalıdır. Bu kesitlerden ilki gözlem, diğeri

sayım kesiti olarak adlandırılır (191). Bir başka yöntem optik disektör yöntemi olarak anılır (191,196). Bu yöntem mikroskopta mikrovida kullanımına ve kesit kalınlığının bilinmesine muhtaçtır. 2 boyutlu bir kesitte mikrovidayla oynayarak görüntünün ilk netleştiği yerden son netleştiği yere kadar değişik görüntüler gözlenmesi optik disektör teriminin manasını tam açıklamaktadır. Bu yerlere alt yüzey ve üst yüzey denir. Bu iki yüzey arasındaki nesnelerin sayım sonucu saydığımız kesitin hacmine bölünürse birim hacimdeki nesne miktarı 'sayısal yoğunluk (N)' olarak bulunur (197,198). Sayısal yoğunluk tüm hacim ile çarpıldığında örneklemden evrene ulaşmış oluruz. Bu yöntemde kesit kalınlığı sayacağımız en uzun partikülden boyca daha büyük olmalıdır ki bir uzun partikülün vertikal uzanması sonucu farklı kesitlerde tekrar sayılma riski azalabilsin. Kesit kalınlıkları genellikle 20 mikron'dan büyük seçilir. Kesit kalınlığını ölçmek için mikrovida kalibre edilebilir veya mikrokator isimli bir alet kullanılabilir. Kesitin tabanı fiziksel disektörün aksine optik disektör sayısal yoğunluk tahmininde taraflılık üretebilir (199). Bu yüzden optik disektör yönteminde kesitin alt ve üstünden yaklaşık 3-5 mikronluk bölgeler sayılmamalıdır (191). Güvenlik kuşağı denen bu bölgelerden sayım yapmak hatadır (200). Üstelik bu bölgeler kesitler hazırlanırken bol artefakt oluşan kesim yüzeyi bölgeleridir. Bu yöntemi kullanmak yoğun partiküllü kesitlerde sayılma kolaylığı ve daha az kesit gerektirmesi nedeniyle zaman, para ve emekten tasarruf gibi yararlar sağlar. Toplam nöron sayısına ulaşabileceğimiz iki temel yol vardır. İki yapının hem hacmine hem de yoğunluğuna odaklanan disektör yöntemi, diğeri ise partikül sayısına odaklanan parçalama 'fractionator' yaklaşımıdır (201). Bu iki yöntemin de kullanılarak sayıldığı nöral yapılar dorsal kök ganglionları, neokorteks, cerebellum, nucleus coeruleus, hippocampus, EC, substantia nigra ve striatum olarak sayılabilir (201,202).

Bir diğer sistematik rastgele örnekleme türü olan optik parçalama; dondurma yöntemi, parafin ve plastik gömme teknikleri için uygundur (191). Çünkü dokuların hazırlanmasındaki büzüşme, şişme gibi artefaktlar sayım sonuçlarını etkilemez. Bu uygulamaya optik disektör yöntemi eklenir. Bütün dokunun partikül sayısı, o dokudan hazırlanmış kesitlerin uygun örnekleme yöntemiyle seçilen alanları incelenerek bulunan sayının doku/kesit oranıyla çarpılması sonucu hesaplanır.

Stereolojiyi çalışmalarda kullanmanın türlü yararları vardır. En başta sonuçlar sayısaldir ve tekrar edilebilir. Bilgisayar sistemleri gibi yeni teknolojilere açıktır ve araştırmacıların bu tekniği öğrenip uygulamaları kolaydır (192). Son yıllarda bu yöntemlerin radyolojik grafilerde kullanımı artmıştır (203).

GEREÇ YÖNTEM

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ (ÜÇÖ)

Yürütülen proje (TÜBİTAK 1001, proje no: 108 S 157) dâhilinde Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde Denizli yöresi *Vitis vinifera* (L. cv. Çalkarası) cinsi üzümlerin pekmez atığı olan çekirdeklerinden elde edilen liyofilize ÜÇÖ kullanıldı. Bu ürünün fenolik içeriği ve ekstraksiyon verimliliği 3. ve 4. tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 3: Pekmez atığı üzüm çekirdeklerinde fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimliliği (Proje raporu, 204).

Toplam Fenol İçeriği (kuru ağırlık bazında)	% 45.1 GAE (Gallik Asit Eşdeğeri)
Toplam Flavonoid İçeriği (kuru madde bazında)	%27.1 KE (Kateşin Eşdeğeri)
Ekstraksiyon verimliliği	%1.12

Tablo 4. *Vitis vinifera* L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'nün gallik asit, kateşin ve epikateşin içerikleri (\pm standart sapma) (Proje raporu, 204)..

Bileşen	Konsantrasyon (mg / 100g LÜÇÖ)
Gallik Asit	53.5 \pm 5.6
Kateşin	65.9 \pm 9.5
Epikateşin	45.4 \pm 8.7

SIÇANLARIN SEÇİMİ

Çalışmada Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Deney aşaması Pamukkale Üniversitesi Deney hayvanları Etik Kurulu izni ve uygulama yönergesi dâhilinde gerçekleştirildi. Sıçanlar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı'ndan elde edildi. Deney boyunca sıçanlar 12 saatlik aydınlık-karanlık devri yaratılan, 22 \pm 2°C lik oda ısısında ve %50 \pm 5 nem ortamında kafeslerde izlendi. Üstleri paslanmaz çelik tel örgülü plastik kafesler kullanıldı. Düzenli kafes temizliği yapılarak sıçanların serbestçe yem ve suya erişmeleri sağlandı.

Deneyin başlangıcında yavruların elde edilmesi için damızlık dişi sıçanlar vajinal sürüntü (smear) yöntemi ile incelendi. Östrus döneminde olan sıçanların vajinal sürüntüsünde epitel hücrelerinin tipik olarak çekirdeksiz, poligonal şekilli süperfisyel yığın oluşturdukları saptandı. Bu görüntünün izlenmesini takiben üç dişi ve bir erkek sıçan olmak üzere bir gece çiftleşmeye bırakıldı. Çiftleşme sonrası erkeklerden ayrılan dişiler vajinal lavaj ile sperm aranmasına tabii tutuldu. Sperm bulunması durumunda o gün gebeliğin 0. günü olarak kaydedildi. Gebe kabul edilen her sıçan yalnız olarak ayrı kafeslere yerleştirildi. Doğan yavrularda anorektal mesafe ölçümü yapılarak erkek ve dişiler tespit edildi. Dişi yavrular deneye alınmazken erkek yavrular deney için işaretlendi. Yavrular kendi başlarına beslenecek büyüklüğe erişinceye kadar anaçların yanında tutuldu. Bu süre zarfında deneye dâhil edilen sıçanların kuyrukları gruplara göre işaretlenerek tanınmaları sağlandı.

YENİDOĞAN SIÇANLARDA HİE MODELİNİN UYGULANMASI

Erkek sıçan yavruları dört gruba ayrıldı.

1.grup (n=5): HİE ve sonrasında beş gün 50 mg/kg/gün üzüm çekirdeği özütü enjekte edilen grup.

2.grup (n=5): Beş gün 50 mg/kg/gün sadece üzüm çekirdeği özütü enjekte edilen grup

3.grup (n=5): Kontrol grubu (Yalancı operasyon).

4.grup (n=5): HİE ve intraperitoneal % 0,9 NaCl uygulanan grup.

Doğumdan sonraki 10. günde 1. ve 2. gruplardaki yeni doğan yavrulara ense bölgesindeki derinin gevşek olduğu bölgeden cilt altı LÜÇÖ enjeksiyonuna başlandı (50mg/kg serum fizyolojik içinde, pH:7,4). Birinci ve dördüncü gruba postnatal 12. günde HİE modeli uygulandı. Birinci ve ikinci gruba postnatal 15.güne kadar (toplam beş gün) LÜÇÖ enjeksiyonuna devam edildi. Dördüncü gruba ise aynı miktar ve sürede % 0,9 NaCl enjekte edildi.

Doğum sonrası 12. günde 1. ve 4. gruba ait yavrular genel anestezi ile uyutulduktan sonra (1cc ketamin+0,5 cc ksilasin + 8,5 cc serum fizyolojik solusyonundan 10 gram canlı ağırlık başına 0,2 cc karışım) modifiye Levin modeli HİE uygulandı (99,205). Bu işlem için biyomikroskop altında sıçan yavrularının boyun ön yüzü, sol yandan yaklaşık 4 mm yatay kesi ile girildi. Fasya ve kaslar künt diseksiyonla ekarte edildi. Sol a.carotis communis bulundu, 4/0 cerrahi suture kullanılarak askıya alınıp, kalıcı olarak bağlandı (Bkz. Şekil 2). Üçüncü gruba ise

aynı şartlarda a.carotis communis bulunduktan sonra bağlanmadan bırakıldı. Kesi yerleri cerrahi suturle kapatılıp yavrular anaç sıçanların yanına bırakıldı, uyanmaları beklendi. Uyanmalarını takiben 1. ve 4. gruptaki yavrular (yaklaşık 1 saat sonra) dakikada 5 litre %8 oksijen %92 nitrojen karışımı verilen bir kabinde bir buçuk saat kadar bekletildi. Ortam sıcaklığı uygulamalar boyunca 33°C civarında tutuldu.

Yavru sıçanlar kendi kendilerine beslenmeye başlamalarından sonra aynı grupta olan sıçanlar ortak kafeslerde olacak şekilde öğrenme testlerinin yapılacağı zamana kadar 8 hafta beklediler.

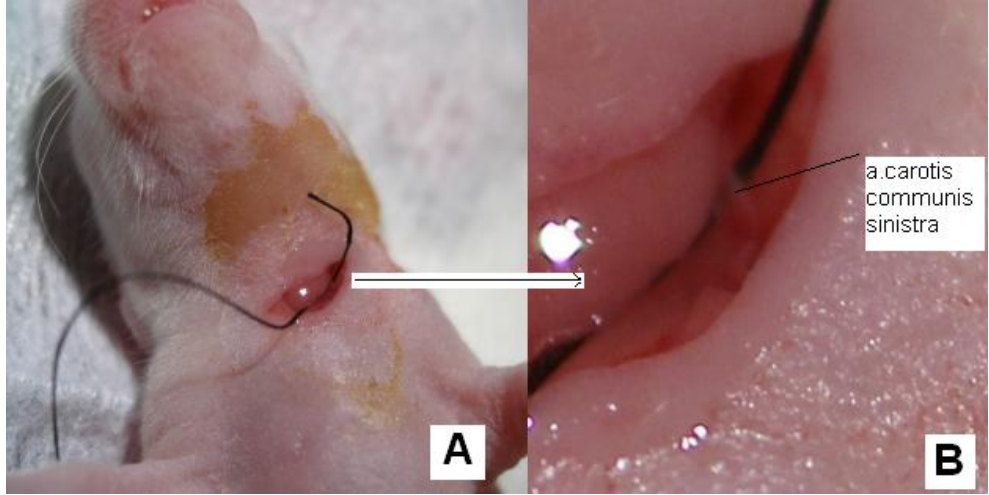
ÖĞRENME TESTLERİNİN UYGULANMASI

Morris Su Tankı Testi'nin Uygulanması

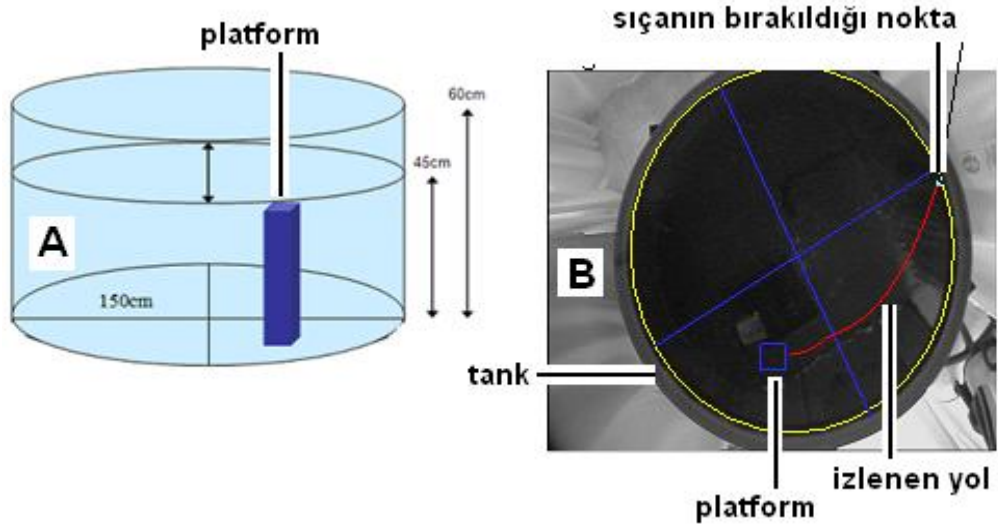
Doğumdan sonraki onuncu haftada su tankı testinin uygulanmasına başlandı. Su tankı uygulaması için Morris tarafından tanımlanmış su tankına göre modifiye edilmiş dairesel, çelik su tankına (150 cm çapında ve 45-60 cm derinliğinde) 23±2 °C' de 32 cm derinliğinde su dolduruldu (14,117). Pleksiglas materyalden 12 cm × 12 cm boyutlarında ve 34 cm yüksekliğindeki platform, yüzeyi su yüzeyinden 2 cm kadar yüksek olacak şekilde su tankının içine yerleştirildi. 4m×3m taban alanı olan bir odada bulunan su tankının etrafındaki duvarlara, havuzun içinden görülebilecek ve sıçan tarafından uzaysal lokalizasyon için kullanılabilir, görsel cisimler yerleştirildi. Test boyunca çevre düzeni değiştirilmedi ve test her sıçan için günün aynı saatlerinde tekrarlandı (Bkz. Şekil 3).

Testin uygulanması: Su tankı kendi içinde 4 farklı sanal kadrana (Kb, Kd, Gb, Gd) ayrıldı. Platform, kadranslardan birinin ortasına sabit pozisyonda yerleştirildi.

Testin başlangıcında (1.gün) sıçanlara alıştırmaya yapıldı (training): Platform su üstünde görünür olduğu halde sıçanlar bir dakika süreyle tank içinde herhangi bir kadrandan bırakılarak yüzdürüldü. Her işlem arası bir saat olmak üzere üçer kez tekrarlandı. Buradaki kayıtlar istatistiksel değerlendirmede kullanılmadı.



Şekil 2: Genel anestezi altındaki sıçan yavrusuna sol a.carotis communis ligasyonunun uygulanması. Şekilde diseksiyon mikroskobu altında cilt-cilt altı ve boyun fasyaları diseke edilerek karotis kılıfı açılmış (A), a.carotis communis, sinir ve venlerden ayrılarak (n. vagus ve v.jugularis interna) 4/0 cerrahi ipek iplikle asılmış olarak görülmektedir (B). İşlemin devamında damar içi kan akışı yönü ve pulsasyon (ven ile karışmayı önlemek için) kontrol edilip bağlanma işlemi tamamlandı. Kan akımının durduğundan emin olunarak 8/0 polipropilen cerrahi iplikle en fazla üç noktadan cilt kapatıldı (Kesi uzunluğu yaklaşık 0,4 cm) (Proje raporu, 204).



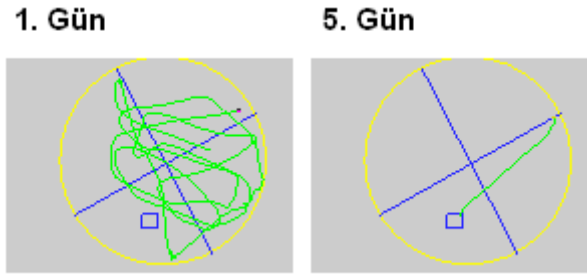
Şekil 3: A: Su tankı testinde kullanılan havuzun şematik görünümü. B: havuzun kamera ile tespit edilmiş üstten görünümü. Mavi çizgiler kadrantları ayırmaktadır. Burada örnek bir uygulama sonrası oluşturulan videoda sıçanın başlangıç noktasından platforma kadar izlediği yol görülmektedir.(Örnek resim daha önce yapılmış bir çalışmadan alınmıştır (206).

İkinci ile altıncı günler arası: Platform su yüzeyinden aşağıda olacak şekilde yerleştirildi, her sıçan için, günde 3 deneme olmak üzere aralıksız 5 gün süreyle denemeler yapıldı. İki sıçan denemesi arasındaki süre bir saat olacak şekilde ayarlandı. Her deneme, platformun bulunduğu kadranda dışındaki 3 kadrandan her birine, sıçanların yüzleri havuzun duvarına bakacak şekilde bırakılmasıyla başladı. Her sıçanın 3 kadrandan hangisinden başlayacağı rastgele seçildi. Her denemede, sıçan platformun üzerine çıkana kadar geçen süre (yüzme zamanı) kaydedildi. 60 sn sonunda platformu bulamayan sıçanlar deneyi uygulayan kişi tarafından platformun üzerine konularak 15 sn süreyle platform üzerinde kalması sağlandı. Her deneme sonunda sıçanlar kafeslerine alındı. Denemeler kamera yardımıyla bilgisayara aktarılarak Ethovision 3.1 bilgisayar programıyla analiz edildi (Bkz. Şekil 4).

Her sıçanın, denemelerdeki performansı,

- Deneğin platforma ulaşması için geçen zaman (Escape latency),
- Platforma ulaşmak için kullanılan yol uzunluğu (Path length)
- Hızı (velocity)

olmak üzere üç parametre açısından değerlendirildi.



Şekil 4: Kat edilen mesafe. Şekilde bir sıçanın testin başında ve sonunda platformu bulmak için kat ettiği yol yeşil çizgi ile gösterilmiştir görülmektedir (örnek resim daha önce yapılmış bir çalışmadan alınmıştır (206).

PERFÜZYON, DEKAPİTASYON, KRANYOTOMİ VE DONDURMA-KESME İŞLEMLERİNİN UYGULANMASI

Erişkin hale gelen sıçan yavrularına davranış testleri uygulandıktan sonra genel anestezi altında perfüzyon yoluyla fiksasyon ve sonrasında da dekapitasyon işlemleri yapıldı. Her gruptan birer hayvan seçilerek işlem sürdürüldü. Genel anestezikler için uygun dozu bulmak amacıyla tartılan sıçanlara intraperitoneal ksilazin/ketamin enjeksiyonu ile anestezi sağlandıktan sonra supin pozisyonda ameliyat masasına sabitlenen sıçanların torakal bölgeleri ön taraflarından sagittal

hat boyunca deri ve derialtı dokuları kesilip ekarte edilerek sternumlarına dek açıldı. Sternum mid-sagittal kesi ile ikiye bölündü ve diaphragma serbestleştirilerek göğüs kafesleri açıldı. Kalp zedelenmeden tutularak kör uçlu bir iğne ucu sol ventriküle 3 mm sokuldu. Peşi sıra sağ atriumda 1-2 mm'lik insizyon açıldı. Sol ventriküle perfüzyon başlatıldı. +4°C'de 100 ml %0,9'luk NaCl solüsyonu sağ atriumdan dışarı çıkan sıvı berraklaşana dek (5-8 dk içerisinde) verildi. Berraklaşmanın ardından 0,1 M fosfat tampon (PB, pH 7,4) içinde 600 ml miktarınca %4'lük paraformaldehit solüsyonu +4°C'de perfüze edildi. Perfüzyon sıvısının ilk 200 ml si hızlı, diğer 400 ml ise yavaşça (yaklaşık 2 saat içinde) gönderildi. Fiksasyon sıvısının perfüzyonuna başlandığında kas seğirmelerinin ortaya çıkışı ile fiksatifin dokulara ulaştığına karar verildi.

Transkardiak perfüzyon sonrası servikal dislokasyon yöntemi kullanılıp sıçanlar dekapite edildiler. Kafaları orta hatta üstten deri insizyonu ile kemiğe kadar kesilip deri ve derialtı dokulardan serbestleştirildiler. Pens yardımıyla kafa kemikleri üstten küçük boyutlarda nazikçe kırılarak beyinleri görünür hale getirildi. Beyinler beyin sapı hizasından kesilip çıkartıldı, tartıldı ve 3 gün fiksasyon solüsyonu içinde +4°C'de bekletildiler. 3 gün içinde tespit olan beyinler peşi sıra %30'luk sükröz solsyonunda 3 gün +4°C'de bekletildiler.

KESİTLERİN HAZIRLANMASI VE BOYANMASI

Kesilen beyinler yuvarlak taşıyıcılara beynin tepesi üste gelecek şekilde horizontal olarak kondu ve -50°C'ye hızlıca getirilerek tespit edildi. Örneklem alınacak beyinler çözdürülüp, kabin içi sıcaklığı -15°C'ye getirilen Lecia CM3050 marka kriyostat aletinde sistematik rastgele örnekleme ile 1/12 oranında 50 mikronluk kesitler alındı. Kesitler önceden jelâtine batırılıp kurutulmuş ve kurşun kalem ile numaralandırılmış lamaların üzerine alındı. Üzerlerinde 2 veya 3 kesit bulunan lamalar lamellerle kapatıldıktan sonra zembile numara sırasıyla dizilip içi ksilen dolu kaplarda 5'er dakika bekletildi. Hemen sonra içleri %100, %100, %70 ve% 50'lik alkol karışımlarının bulunduğu kaplarda aynı sırayla 5'er dakika boyunca bekletildi. Peşi sıra zembil kesitleri lamdan dökmeyecek yumuşaklıkta akan suyun altına konarak alkolden hafifçe arındırıldı. Ardından zembil kresil viyole boyasında 5 dakika boyunca bekletildi ve aynı usulde akan suyun altında kap içindeki sıvı berraklaşana kadar bekletildi. Yıkanma işlemi bittikten hemen sonra zembildeki fazla su kâğıt havlulara akıtılarak kesitler sırayla % 50, %70, %100 ve %100'lük alkol solüsyonlarının bulunduğu kaplardan 5'er dakika geçirilip dehidrate edildi. İçi

ksilen dolu kaplarda 5'er dakika bekletilen kesitler uygun lamel ve yapıştırıcı ile kapatıldı. Lamel ile kapatılmış kesitler ortalama 3 gün boyunca kurutularak birbirlerine yapışmaları önlenildi. Kapatılmış lamel ışık mikroskobu altında incelenip boyanması kötü bulunanlar 1 gün boyunca ksilen kabı içinde bekletilerek lamellerinden ayrılıp tekrar kapatıldı. Hazırlanan kesitlerde GD bölgesi uygun stereolojik yöntemlerle ışık mikroskobu altında sırasıyla 4'lük ve 100'lük büyütmelede görüntünün video kamera yoluyla bilgisayar monitörüne aktarılmasıyla sayıldı. Deneyin aşamaları tablo 5'de özetlenmiştir.

Tablo 5: DENEYİN ÇALIŞMA PLANI

sıra	GÜN/SÜRE	İŞLEMLER
1		Wistar albino türünde dişi sıçanların smear takibi ile döllenmeye uygun zamanlarının tayini
2		Pozitif vajinal smear sonucu döllenmeye uygun dişilerin aynı tür yetişkin erkek sıçanlarla aynı kafese konulması
3	Gebeliğin 0. günü	Vajinal smearlarda sperm bulunan sıçanların gebe kabul edilmesi
4		Yavruların doğması, erkek yavruların beşerli gruplara bölünmesi
5	Postnatal 10.-15 günler arası	Birinci ve 2. gruba seçilen erkek yavrulara 5 gün boyunca subkutan yol ile 50mg/kg/gün (pH:7,4) özütle uygulanması
6	Postnatal 12. gün	Birinci ve 4. gruba seçilen erkek yavrulara hipoksi iskemi modeli uygulanıp ve yavruların yaklaşık 1 saat sonra bir kabin içinde 1,5 saat boyunca 5 l/dk %8 oksijen ve %92 nitrojen karışımına maruz bırakılması
7		Tüm grupların süt alımları kesilene kadar anaçlarının yanlarında kalmalarının sağlanması
8		Anaçlarından uzaklaştırılmaları
9	Yetişkin dönem (postnatal 120.gün)	Tüm grupların genel anestezi altında transskardiyak perfüzyon yoluyla fiksasyon, dekapitasyon, kraniyotomi yapılması ve beyinlerinin çıkartılıp tartılması
10	3 gün boyunca	Beyinlerin +4 ⁰ C'de fiksasyon solüsyonunda tespit edilmeleri
11	3 gün boyunca	+4 ⁰ C'de %30'luk sükröz solüsyonunda bekletilmeleri
12		Kriyostat cihazında -15 ⁰ C'de 50 mikronluk seri kesitlerin alınması
13		Kesitlerin -20 ⁰ C'de boyama işlemine dek saklanması
14		Cresyl violet ile boyama işleminin yapılması
15		Kesitler stereolojik yöntemlerle sayılıp, bulguların istatistiğinin yapılması

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI

Beyinden alınan her 12 kesitin ilk 11'i atılıp sonuncusu lama kondu. Bu seçme işlemi bir sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle optik parçalama yöntemidir. Kesit örnekleme oranı (KeÖO) bizim çalışmamızda 1/12'dir. Çünkü 12 kesitten sadece 1 tanesi kullanılmıştır. Bu sayede GD'nin bulunduğu yaklaşık 10-16 horizontal kesit hazırlanmıştır.

Alan örnekleme oranı (AÖO) toplam hücre sayısını hesaplamaya yönelik KeÖO'ndan ayrı bir parametredir. Hazırlanan kesitler Olympus CX31 markalı bir ışık mikroskobunun merceğinden görüntü yakalayabilecek aparatlar takılmış (Exwave HAD Color Video Camera SSc-DC88P markalı) bir video kamera sayesinde görüntünün bir bilgisayar monitörüne yansıtılmasıyla incelendi. Bilgisayar monitörünün üzerine Adıgüzel ve arkadaşlarının tariflediği Thoma lamı kalibrasyon yöntemi esas alınarak cam kalemiyle çizilmiş bir kare olan asetat bantlanmıştır (207). Asetatın üzerindeki büyük karenin bir kenarı 100X'lük büyütmede 50 mikrondur. Sayım yapacağımız yasak ve serbest kenarların çerçevelediği tarafsız sayım çerçevesinin her kenarı 20 mikrondur. Her üç adımda bir sayım yapıldığı için alan örnekleme oranı 4/75 olarak hesaplandı.

Bu büyütmedeki hücreler Shtereom adlı bir bilgisayar programı aracılığıyla sayılmıştır. Shtereom programı, masaüstünün görüntüsü üstünde programın oluşturduğu kendi şeffaf masaüstü bölümü içine her fare tıklatıldığında bir sayım olarak kabul eden, toplam sayıyı çerçeveler (frame) içinde, çerçeveleri de kesitler (section) içinde sınıflayan ve tüm bu verileri MS-excell dosyası olarak kaydedebilen bir programdır. Mikroskop görüntüsü Aver media adlı program ile bilgisayar monitöründe izlendi. Her kesit 4X'lük büyütmede bakılıp mikrovida ile netlik kazandırıldıktan sonra GD bölgesi arandı. GD bulunduğu lamın üzerinden 4X'lük okuler uzaklaştırılıp üzerine immersiyon yağı döküldü. Netliğiyle oynanmadan 100X'lük büyütmeye geçirilen görüntü üzerindeki tarafsız sayım çerçevesinin içinde kalan hücreler mikrovida oynatılarak belirlenip shtereom programında sayıldı (Şekil 6).

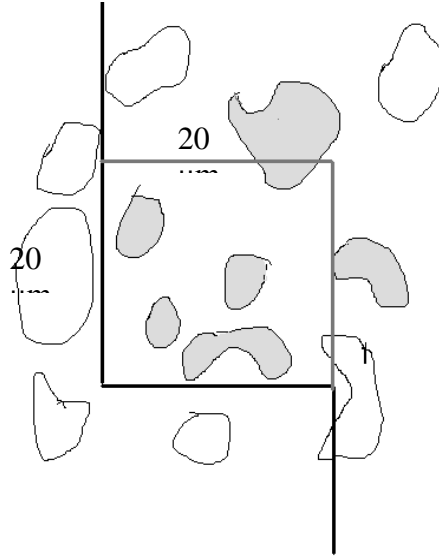
Kesit kalınlığını mikrovida kalibrasyon yöntemiyle ölçüldü (208). Işık mikroskobunda kullanılan bu yöntem mikroskobun mikrovidası döndürülerek görüntünün ilk ve son netleştiği yerlerdeki açı farkının hesaplanmasıyla uygulanır. Çalışmamızda 1 derecelik hareket 0,5 mikrona karşılık gelmektedir. Tüm kesitlerin kesit kalınlığı (t) bu şekilde ölçülüp ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) ölçüldü. Kesit alırken oluşan artefaktların yol açacağı sayım hatalarından kurtulmak için kesitin 5 mikron

üstünden ve altından toplam 10 mikron mesafeli bir güvenlik aralığı bırakıldı. Tüm kesitin yüksekliğinden 10 mikronluk güvenlik kuşağı çıkartılarak disektör yüksekliği (h) belirlendi. Bu yolla ortalama disektör yüksekliği hesaplandı (h_{ort}). Kalınlık örnekleme oranı ($Ka\ddot{O}O$) h_{ort}/t_{ort} şeklinde her sıçan için ayrıca hesaplandı. Çalışmamızda $h_{ort} = 40$ mikron, $t_{ort} = 50$ mikron'dur.

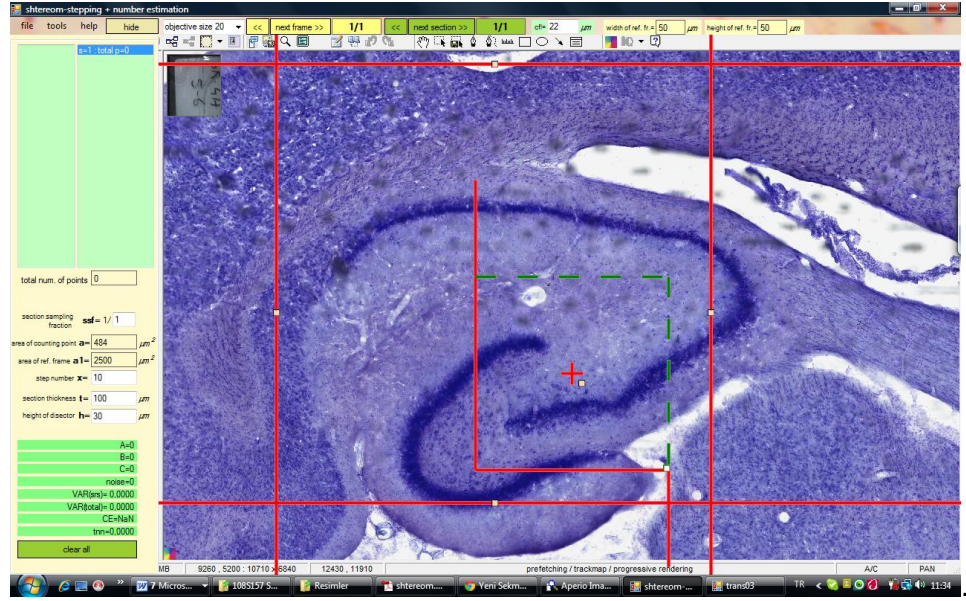
Sayım işleminde hücreleri belirlerken kişilerce farklı yöntemler tercih edilebilir. Hücrelerin membranları veya nükleusları sayılabilir bu belirleme için ki bu çalışmada iki parametreden de yararlanıldı. Çalışmamızda gyrus dentatus'un granüler tabakalarındaki hücreler sayılmıştır. Söz konusu bölgede istatistikî yeterlilik amacıyla 1/3 adımlama yapıldı. Her kesitin toplam nöron sayıları sheretom programında kayda alınıp ($\sum Q = \text{toplam disektör partikül sayısı}$) her sıçanın toplam nöron sayısı bu kesitlerden bulunan sayılar toplanarak bulundu (Tablo 6). Daha sonra toplam nöron sayısı (N) şu formülle hesaplandı.

$$N(\text{toplam}) = (\sum Q) \times (1/Ke\ddot{O}O) \times (1/A\ddot{O}O) \times (1/Ka\ddot{O}O).$$

Hata katsayısı örnekleme planının yeterliliğini gösteren bir kontrol ölçөгüdür ki her bir sıçan için sayılan kesit sayısı ve her kesit için hesaplanan disektör partikül sayısı kullanılarak bulunur.



Şekil 5: Yasak kenar. Tarafsız sayım çerçevesinde koyu gösterilen devamlı çizgi yasak kenarı, açık renkli çizgi sayıma dâhil edilen serbest kenarı göstermektedir. Gri lekeler sayıma dâhil eden partiküleri temsil etmektedir.



Şekil 6: SHTEREOM[®] yazılımında hücre sayım modülünün demonstratif görüntüsü. Büyüklüğü 50X50 μm^2 olan adımlama alanını ve içinde 20X20 μm^2 büyüklüğünde tarafsız sayım çerçevesi görülmektedir. Her üç adımda bir tarafsız sayım çerçevesi yardımı ile sayım yapıldığı için 7500 μm^2 adımlama alanı içinde 400 μm^2 alanda sayım gerçekleştirilmektedir.

İSTATİSTİK

Grupların elde edilen verileri SPSS for Windows version 18.0 programında analiz edildi. Tek yönlü ANOVA testi ile gruplar arası ortalamaların farklılığı test edildi. Post Hoc test olarak Bonferroni kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Tablo 6: SHTEREOM® programı yardımı ile elde edilmiş, bir sığana ait hücre sayımı ve toplam hücre sayısını gösterir tablo.

Büyük tablo hata katsayısı (CE) hesaplanmasında kullanılacak olan değerlerin (A, B, C) hesaplanmasında kullanılacak olan parametreleri göstermektedir. Küçük tabloda ise hesaplanmış hata katsayısı ve toplam nöron sayısı (tns) yer almaktadır.

shtereom©

stepping section no, i	+number estimation Qi	Qi x Qi	Qi x Qi+1	Qi x Qi+2
1	26	676	546	1066
2	21	441	861	252
3	41	1681	492	410
4	12	144	120	96
5	10	100	80	120
6	8	64	96	120
7	12	144	180	108
8	15	225	135	225
9	9	81	135	126
10	15	225	210	0
11	14	196	0	0
	total=183			

A= 3977

B= 2855

C= 2523

Noise= 183

VAR(srs)= 103.541.667

VAR(total)= 1.933.541.667

CE= 0.0759846

TNS= 823.500

BULGULAR

ÖĞRENME TESTLERİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

Morris Su Tankı Testi (Water Maze) Bulguları

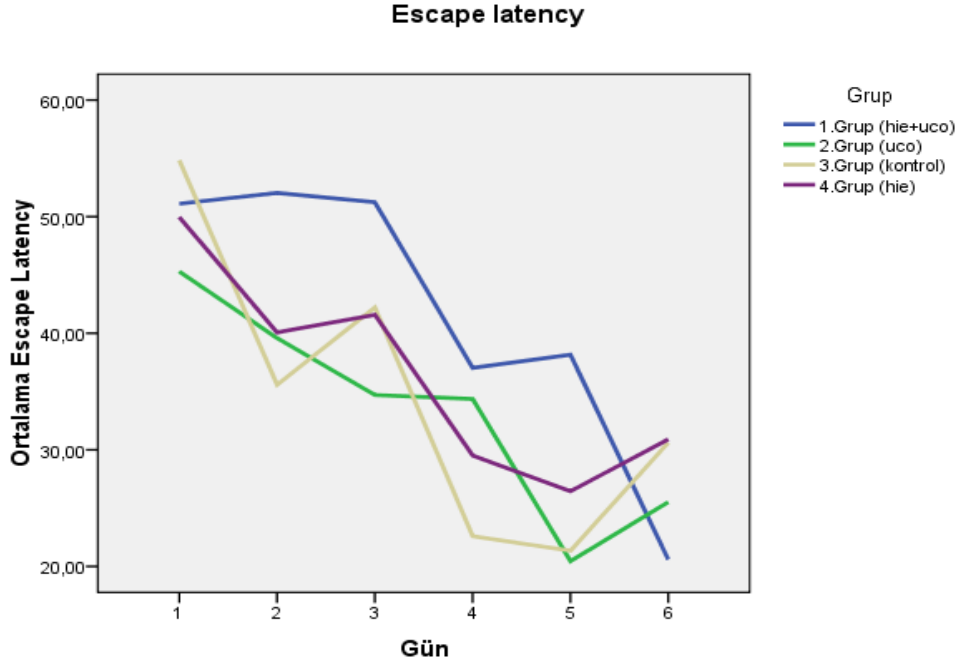
Zaman açısından (escape latency) 1.grup ile 2.grup ($p=0,012$) ve 3.grup ($p=0,034$) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 7, Şekil 7). Yol açısından (path length) ise sadece 1. ve 2. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($0,031$).

Hız (velocity) bakımından gruplar arasında fark olmaması, deneye katılan hayvanların su tankı testini etkileyecek herhangi bir motor bozukluk göstermedikleri yönünde değerlendirildi (Şekil 9). Bu sonuç testin güvenilirliğini artırmaktadır.

Zaman açısından oluşturulan çizgi grafikte (Şekil 7) birinci grubun en kötü performansı gösterdiği görülmektedir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 7). Birinci gün *pretraining* safhası olduğundan istatistik işlemlerine alınmamıştır. Ancak diğer günlerde kontrol grubu da dâhil olmak üzere performansın değişmeler gösterdiği açıktır.

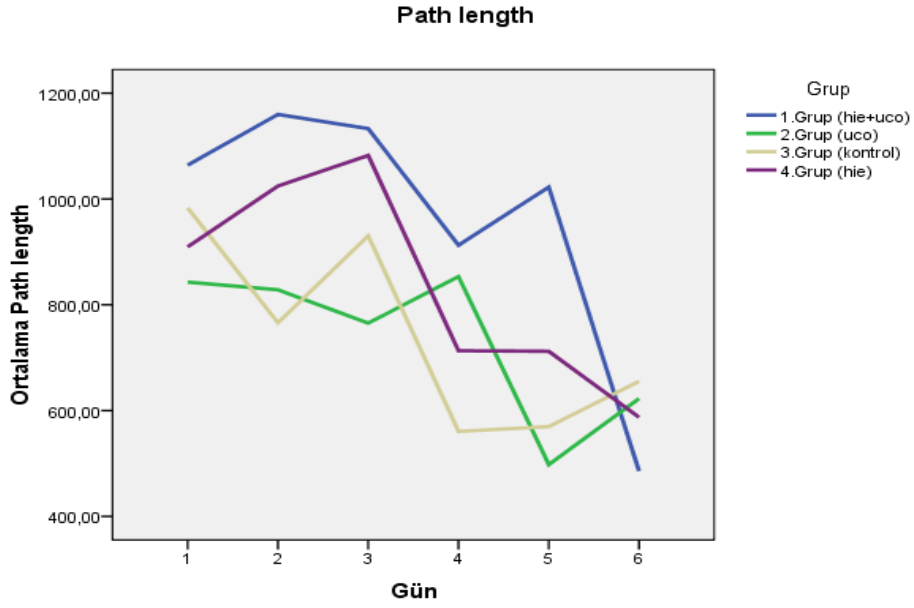
Tablo 7: Morris su tankı testi (The Morris Water Maze) sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri tablosu. (tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü ANOVA, Post Hoc Tukey testi) (Proje raporu, 204).

Gruplar	Karşılaştırılan gruplar	Escape Latency (Duration, zaman) p	Path Length (Distance, yol) p	Velocity, Hız p
1.grup	2.grup	0,012	0,031	0,957
	3.grup	0,034	0,062	0,943
	4.grup	0,226	0,495	0,625
2.grup	3.grup	0,999	0,998	0,767
	4.grup	0,828	0,738	0,375
3.grup	4.grup	0,822	0,722	0,951

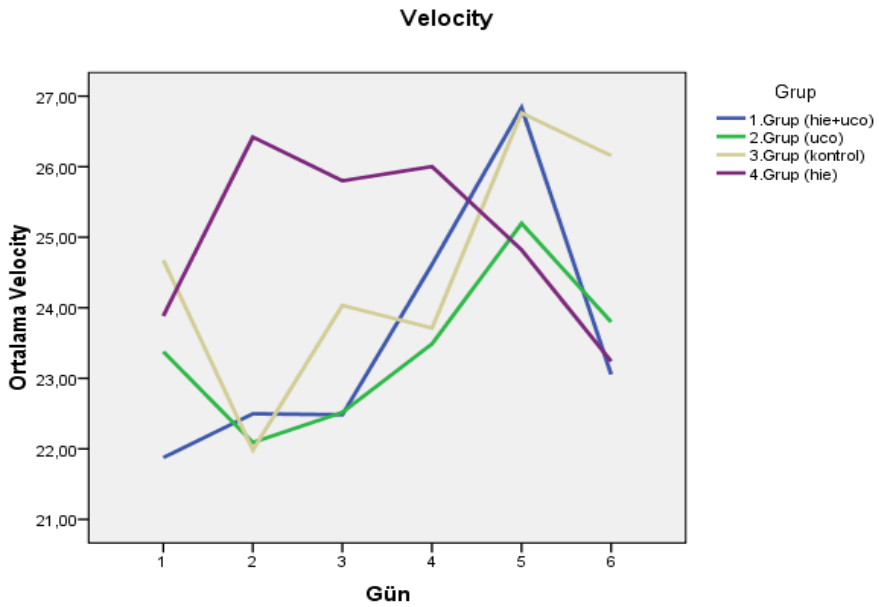


Şekil 7: Sıçanın platforma ulaşması için geçen zaman açısından (Escape Latency, saniye) grupların karşılaştırılması. Birinci grubun en kötü performansı gösterdiği görülmektedir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu, p değerleri Tablo 7’de verilmiştir (Proje raporu, 204).

Yol uzunluğu karşılaştırması ile ilgili çizgi grafikte (Şekil 8), zaman ile uyumlu olacak şekilde 1.grubun en kötü performansa sahip olduğu görülmektedir. 2. ile 3. grubun ve 1. ile 4.grubun benzer grafiklere sahip olduğu görülmektedir. Buna göre 2. ve 3. gruplar 1. ve 4. gruplara göre daha başarılıdır. Şekil 8’e göre HİE yol uzunluğunu arttırdığı için hayvanın öğrenme ve belleğini azaltan bir faktördür. Ancak 4. gruba göre 1.grubun daha kötü performansa sahip olması HİE’nin yanı sıra verilen LÜÇÖ’nün tabloyu ağırlaştırdığı anlamını çıkartabilir. LÜÇÖ’nün etkisinin olmadığı 2. grup ise yol uzunluğu açısından en kötü ikinci grup olarak saptandı. İkinci grubun bu sonucu oksidatif stresin sinaptik dezorganizasyon ve nöral sinyal disfonksiyonu yaratmasına bağlı olabilir (209).



Şekil 8: Deneğin platforma ulaşması için kat ettiği yol. (Path Length, cm) açısından grupların karşılaştırılmasında 1. grubun en kötü performansı gösterdiği görülmektedir, sadece HİE uygulanan 4.grup ise nispeten daha iyi bir performans göstermesine rağmen kontrol gruplarına (2, 3. gruplar) göre daha uzun yol kat ettikleri görülmektedir. Bu karşılaştırmada da 1. ve 2. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Bkz. Tablo 7) (Proje raporu, 204).



Şekil 9: Sıçan gruplarının ortalama hızı. Ortalama hız (Velocity, cm/sn) açısından karşılaştırıldığından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bu durum test edilen sıçanlarda motor yerersizlikten kaynaklanan bir fark olmadığını kanıtlağığı için testin güvenilirliğini artırmaktadır (Proje raporu, 204).

BEYİN AĞIRLIĞI AÇISINDAN GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Dekapitasyon ile sonlandırılan deney süreci sonunda sıçanların vücut ve beyin ağırlıkları bakımından gruplar arasında farklılıklar olduğu görüldü (Tablo 8, Şekil 10). Birinci grupta olanların diğer gruplara göre en az vücut ağırlığı ve beyin ağırlığı ortalamasına sahip oldukları, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Tablo 8, Şekil 10).

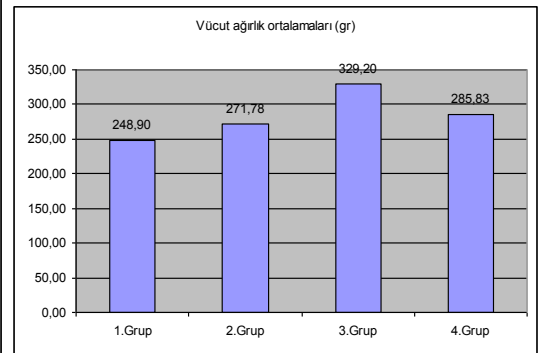
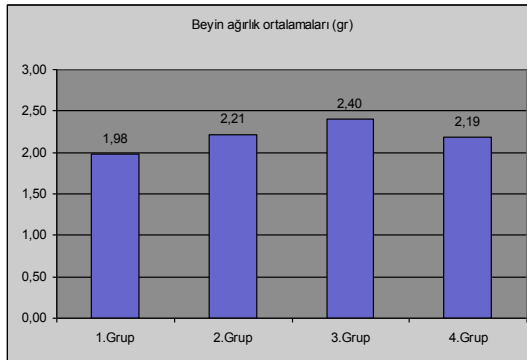
En yüksek vücut ağırlığı ve beyin ağırlığı ortalamasınının 3. gruba ait olması deneyin güvenilirliği açısından olumlu bir bulgu olarak değerlendirildi. Fakat istatistikî olarak 3. grup ile diğer gruplardan sadece 1. grup ile anlamlı fark bulundu ($p=0,000$). 1. grup ise diğer 3 gruba da istatistiksel olarak anlamlı fark yarattı (Bkz. Tablo 8). Makroskopik incelemede de özellikle 1. grupta yer alan sıçanların biri hafif, dördü ağır olmak üzere beşinde beyin dokusu kaybı olduğu saptandı (Şekil 11).

Vücut ağırlığı bakımından en yüksek ortalamaya sahip olan 3. grubun diğer tüm gruplarla bire bir farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Birinci ile 2. grup ve 2. ile 4. grup arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, 1. grup ile 4. grup arasındaki farkın ise anlamlı olduğu görüldü (Tablo 8).

Bu sonuca göre beyin ve vücut ağırlığı bakımından HİE uygulamasının yanı sıra LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan sıçanlarda (1.grup) daha fazla beyin dokusu kaybı ve vücut ağırlığında azalma olduğu saptandı. Sadece HİE oluşturulması veya sadece LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan sıçanlarda ise normal sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan beyin ve vücut ağırlığında azlık olduğu görüldü. HİE oluşturulması ve LÜÇÖ enjeksiyonununun ayrı ayrı bu olgulara katkıda bulunduğu, ancak her ikisinin bir arada uygulanmasının olayı daha da artırdığı izlenimine varıldı.

Tablo 8: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamaları. p değerleri gruplar arası karşılaştırmayı gösterecek şekilde verilmiştir (1-2, 3: birinci ile ikinci ve üçüncü grubun karşılaştırılması gibi) (Proje raporu, 204).

Gruplar	Beyin ağırlık ortalamaları (gr)	SE	SD	Grup- grup: P değeri	Vücut ağırlık ortalamaları (gr)	SE	SD	Grup- grup: P değeri
1.grup	1,98 (1,75-2,37)	0,06	0,18	1-2: 0,006	248,90 (227-274)	5,30	16,76	3-1,2: 000
2.grup	2,21 (2,07-2,42)	0,04	0,11	1-3: 0,000	271,78 (232-310)	8,58	25,74	3-4: 0,010
3.grup	2,40 (2,15-2,50)	0,06	0,14	1-4: 0,037	329,20 (314-347)	6,01	13,44	1-2= 1
4.grup	2,19 (2,06-2,30)	0,04	0,09	3-2,4: 0,1	285,83 (260-321)	8,57	20,99	4-1: 0,010
				2-4: 1				4-2: 1



Şekil 10: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamalarının çubuk grafik ile gösterilmesi (Beyin ağırlığı açısından p değerleri: 1-2 gruplar= 0,006, 1.-3. gruplar arası= 0,000, 1-4 gruplar arası= 0,037, 3-2. ve 3-4. gruplar arası= 0,1, 2-4 gruplar arası= 1 olarak bulundu. Vücut ağırlıkları açısından p değerleri: 3-1. ve 3-2. gruplar arası =000, 3-4gruolar arası=0,010, 1-2gruolar arası= 1, 4-1 ve 4-3 gruplar arası=0,010, 4-2 gruplar arası=1. Vücut ağırlıkları bakımından p değerleri 3.-1.ve 2. gruplar arası=0,000, 3-4 gruplar arası =0,010, 1-2gruolar arası = 1, 4-1 gruplar arası =0,010, 4-2 gruplar arası=1) (Proje raporu, 204).



A



B



C



D



E



F

Şekil 11: Beyinlerdeki makrosopik değişiklikler ile ilgili resimler: A: Üçüncü gruba ait normal beyin, B,C,D: Birinci gruba ait sıçanlardan birinde görülen hafif doku kaybı. EF: Aynı gruptaki başka sıçandaki yoğun doku kaybı (Proje raporu, 204).

TOPLAM NÖRON SAYISI BULGULARI

Grup başına 5 sıçan olarak 4 gruba ait toplam 20 sıçanın GD'leri sağ ve sol olarak stereolojik yöntemlerle sayılıp hesaplandı. 1.grupta 2 numaralı sıçanın sol tarafında deneyin sonucunda gelişen atrofi GD'yi de içerdiği için tns'leri gösteren Tablo 9'da 'atrofik' yazısıyla belirtilmiştir. Tablo 9'da görüldüğü üzere 1.grubun

(HİE+ÜÇÖ) sağ taraflarındaki tns'ler sol taraflarına göre hafifçe yüksektir fakat bunun istatistiksel bir anlamı yoktur. İkinci grubun ise 5 numaralı hayvanı hariç sol taraflarında daha yüksektir. Kontrol grubu olan 3.grubun tns'si daha yüksek olan belli bir taraf söylenemez. Dördüncü grubun ise 1 numaralı hayvan hariç sağ tarafların tns'si daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda a.carotis communis ligasyonunu sıçanların sol taraflarından yapıldı. Bu yüzden HİE'nin yapılmadığı 2. ve 3. gruplar haricindeki hayvanlarının tns'lerinin sol taraflarında daha düşük çıkması beklenen bir sonuç oldu. Fakat tns'nin HİE geçirmiş gruplarda sağ tarafta yüksek çıkması istatistiki olarak anlamlı bulunmadı.

Grupların toplam nöron sayıları Tablo 11'den incelendiğinde en yüksek tns ortalamasına sahip grubun ikinci grup, en düşük tns ortalamasına sahip olan ise 1.grup olduğu bulundu. Kontrol grubuna (3. grup) göre 1. grubun yarattığı tns düşüşünün 4.gruptan daha düşük bulunması ve 2.grubun 3.gruptan daha yüksek tns ortalamasına sahip olması LÜÇÖ'nün hayvanın fizyolojik durumuna göre farklı davrandığını gösterir. Yani hipoksi-iskemi yapıp LÜÇÖ verilen sıçanlardaki nöron hasarını ve nörogenezini düzeltmemiş aksine bozmuştur.

Tüm gruplar içinde 2. grubun maksimum değerinin diğer üç grubunkine göre daha yüksek olması LÜÇÖ'nün sağlam hayvana verilmesinin yararlı olabileceği yönünde düşündürür fakat bu konuda geliştirilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır (Tablo 11).

En düşük tns ortalamasına sahip grup, en düşük beyin ağırlığına sahip grup ve yüzme testlerinde en başarısız grup 1. gruptur.

Tablo 9: Hayvanların sağ-sol toplam nöron sayısı (tns) farkları. Her bir hayvanın sağ ve sol gyrus dentatuslarındaki toplam nöron sayılarını (tns), stereolojik sayım yöntemleriyle sayılan nöron sayısı (ΣQ^-), ve hata katsayılarını (HK) göstermektedir.

Gruplar	Sıçan No	Sol gyrus dentatus			Sağ gyrus dentatus		
		tns	ΣQ^-	HK	tns	ΣQ^-	HK
Grup 1 (HİE+ÜÇÖ)	1	75094	267	0,07269	84375	300	0,05315
	2	atrofik	atrofik	atrofik	62438	222	0,08145
	3	93938	334	0,06059	99281	353	0,0596
	4	68344	243	0,04585	66375	236	0,06149
	5	49781	177	0,0432	55406	197	0,04408
Grup 2 (ÜÇÖ)	1	122063	434	0,03493	112500	400	0,0391
	2	56531	201	0,0567	54844	195	0,05179
	3	95906	341	0,06323	77344	275	0,05151
	4	86344	307	0,06768	74813	266	0,02495
	5	75094	267	0,02807	86344	307	0,04407
Grup 3 (kontrol)	1	90000	320	0,03703	62719	223	0,02951
	2	79313	282	0,03181	84938	302	0,04944
	3	58500	208	0,06066	56531	201	0,04518
	4	45563	162	0,05643	63281	225	0,07073
	5	93094	331	0,02683	84938	302	0,04657
Grup 4 (HİE)	1	57656	205	0,02483	43031	153	0,03212
	2	70031	249	0,04664	90563	322	0,07189
	3	56813	202	0,06563	65531	233	0,05558
	4	78469	279	0,06492	80438	286	0,07089
	5	70594	251	0,0519	94781	337	0,06894

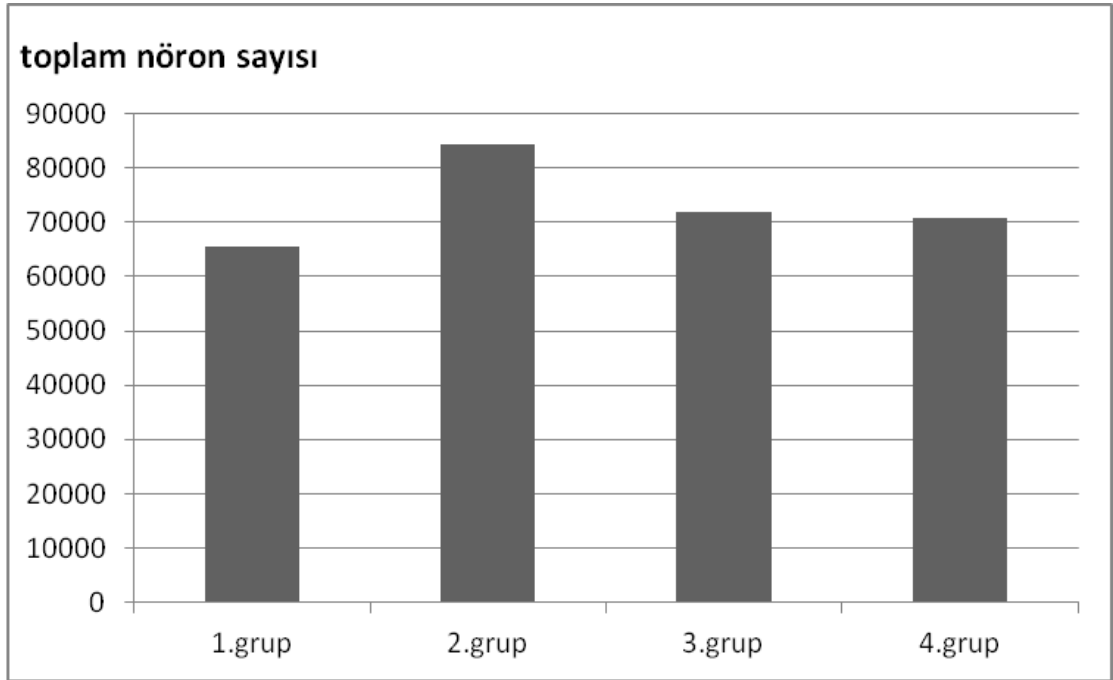
Toplam nöron sayıları (tns) açısından gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p=0,258$) (Tablo 10).

Tablo 10 – Gruplar arası p değeri. Toplam nöron sayıları ortalamaları açısından gruplar arası farkın anlamlılığını gösterir istatistik test sonucu (ANOVA) ve p değeri

Tns- ANOVA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.(p)
Between Groups	1,872E9	3	6,241E8	1,404	,258
Within Groups	1,601E10	36	4,446E8		
Total	1,788E10	39			

Tablo 11 - Grupların toplam nöron sayısı ortalamaları. Gruplar arası farkın anlamlılığı tablo 10'da gösterilmiştir ($p=0,258$).

gruplar	tns	SD (Standard deviasyon)	SH (Standard hata)	Minimum	Maximum
1.grup	65503	27999	8854,15	0	99281
2.grup	84178	21669	6852,49	54844	122063
3.grup	71888	16464	5206,52	45563	93094
4.grup	70791	15934	5039,05	43031	94781



Şekil 12: Dört grubun toplam nöron sayılarının karşılaştırılması. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0,258$)

GD gibi değişim içinde olan beyin yapılarına yönelik etkenleri beyin kesitlerinde incelemek için akut değil kronik dönemdeki sonuçlar daha değerlidir. Çünkü dekapitasyon işlemini yaptığımız zamana göre tns sonuçları değişir. Bir çalışmada gerbillere 10 dakika boyunca bilateral a.carotis communis oklüzyonu yapıp geçici global iskemi oluşturulmuş ve 1-2 hafta sonra bakılan BrdU, GD'nin subgranüler tabakasında 12 kat artış sağlamıştır (32). Bu çalışmada gerbillerin iskemi ile başlayan nörogenezleri iskemi sonrası 9-11. günlerde maksimuma, 3 gün sonra da kontrol düzeylerine ulaştığı saptanmıştır. Bu yüzden çalışmamızda dekapitasyon işlemi yetişkin dönemde yapıldı.

Çalışmamızda hippocampus'ta oluşan bellek hasarı ile ilgili olarak, erişkin hale gelen HİE uygulanmış sıçanların öğrenme performansları Morris su tankı testi ile kontrol edildi.

Genel olarak elde edilen sonuca bakıldığında tüm gruplarda test uygulamasının sonunda tüm sıçanların test sürecinde amaçlanan davranışı öğrendiği görülmektedir (Şekil 7, 8). Ancak öğrenmenin süre ve yol uzunluğu gibi parametrelerinin ortalamaları gruplar arasında farklılık göstermektedir. Sonuçta öğrenmenin gerçekleşmesi HİE modeli ile oluşturulan beyin hasarının öğrenme fonksiyonunu tamamen ortadan kaldırmadığının bir kanıtıdır. Bu araştırmadan beklenen sonuç HİE uygulanan grubun kontrol grubuna göre anlamlı bir fonksiyon kaybı göstermesi idi. Ancak bulgularımızda su tankı testi sonuçlarına göre HİE uygulanan 4.grup ile 3. grup (kontrol) arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir fark bulundu (Şekil 7, 8). Hem HİE uygulanıp hem de LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan grupta (1.grup) ise kontrol grubuna göre olumsuz olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü. Bu sonuç denek sayısının azlığı nedeniyle istatistik testlerinin sonuçlarının etkilenmesinden kaynaklanacağı gibi, dördüncü grupta HİE uygulanmasının başarısız olduğu yönünde bir şüpheyi de doğurmaktadır.

Grupların vücut ağırlıkları sıralaması ile beyin ağırlıkları sıralaması benzer bulundu. Vücut ağırlığı açısından (Bkz. Şekil 10) ÜÇÖ'nün kendi başına sıçanın vücut ağırlığını azaltması, en düşük ortalamanın da grup 1'de olması ÜÇÖ'nün ağırlığı azaltan bir etkiye sahip olduğunu düşündürebilir. Fakat uluslar arası birçok makalede ÜÇÖ'nün böyle bir özelliği olduğu bildirilmemiştir (3,4,15,112,136,137,139).

Beyin ağırlıkları açısından yapılan karşılaştırmada, HİE uygulanan 4. grup sıçanların kontrol grubuna göre daha düşük beyin ağırlığı ortalamasına sahip olması ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olması deneyin hatalı olduğu

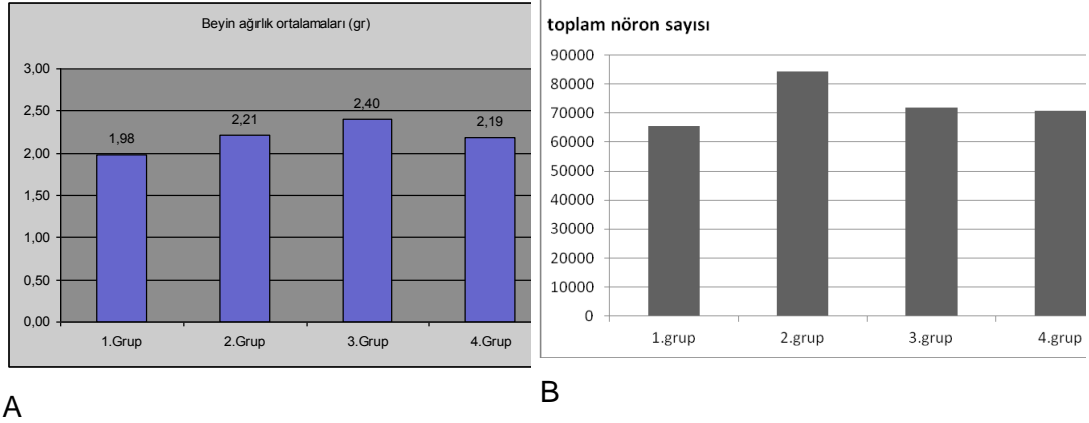
şüphesini ortadan kaldırmaktadır. Deney hazırlıkları aşamasında LÜÇÖ verilen anaç sıçanlarda oluşan yavru kaybı ve ölümler de göz önüne alındığında HİE oluşturulan sıçanlarda LÜÇÖ enjeksiyonunun hasarı daha da artırdığı ortaya çıkmaktadır. Bu hazırlanan LÜÇÖ solüsyonunun bekletilmesinden kaynaklanan oksidan strese atfedilebilir. Bu yüzden çıkardığımız sonuçlardan birisi solüsyonların taze verilmesi gerektiği yönündedir. Ancak bu iddiayı güçlendirmek için deneyin tekrar edilmesi şarttır.

Mishima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da uzun süreli takipte HİE'nin öğrenme, özellikle uzaysal hafıza ile ilgili progressif bozulmaya yol açtığı sekiz kollu labirent testi ile gösterilmiştir (212). Ancak su tankı testinde aynı sonucun elde edilememesi bu tespiti desteklemektedir.

Deneysel HİE oluşturulan sıçanlarda beyin ağırlığı ve hacmindeki azalma daha önceki çalışmalarda da gösterilmiş bir bulgudur (215). Bizim çalışmamızda beyin ağırlığı en çok azalan grup 1.grup oldu. Hatta bu gruptaki 2 numaralı sıçanın beyninin sağ tarafı atrofiye uğradığı için GD'de nöron sayımı yapılamamıştır. Bu azalma dokudaki büyük defektlerin yanı sıra daha ılımlı kayıpları da içermektedir. Hippocampusun boyutu ve nöron sayıları Alzheimer hastalığında ve temporal lob epilepsisinde de azalır (216). Harding ve arkadaşları nörolojik olarak normal insanların farklı beyin bölgelerini (CA1,CA2-3, CA4, GD, subiculum, presubiculum ve beyaz madde) belirleyip optik disektör tekniği kullanılarak nöronları saymıştır. Cerebrum hacmi ile en çok CA1 bölgesinin nöron sayısı arasında anlamlı ilişki (%69) saptanmıştır (216).

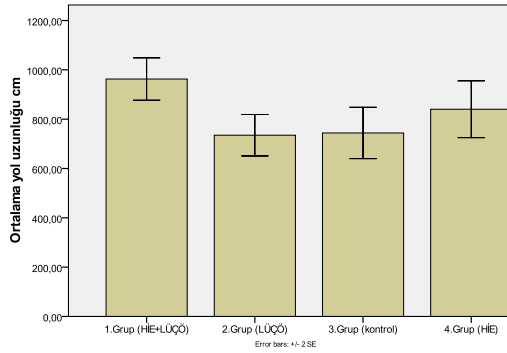
Ten ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada a.carotis communis ligasyonunun yanı sıra 30 ve 60 dakikalık hipoksi uygulanan iki gruptaki infarkt alanlarının karşılaştırılmasında 60 dakika hipoksi uygulanan grupta infarkt alanının daha geniş olduğu gösterilmiştir (215). Benzer çalışmalarda da infarkt alanı veya hipoksik iskemiden etkilenen beyin dokusu mm² olarak ölçülmüş ve öğrenme-bellek azalması ile ilişkisi araştırılmıştır (212). Mishima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu durum hem MRI görüntüleri, hem de post-mortem beyin kesitlerinde yapılan ölçümler ile ortaya konulmuş, hasarın zamana bağlı olarak progressif olduğu da kanıtlanmıştır.

Bizim çalışmamızda beyin ağırlıkları ölçülerek yapılan karşılaştırmada HİE+LÜÇÖ uygulanan birinci grubun beyin ağırlığı diğer gruplara göre daha az bulundu (Tablo 9). Bu durum öğrenme testleri sonuçları ile paralellik göstermektedir (Şekil 14).



A

B



C

Şekil 14: Beyin ağırlıkları. Çalışmamızda elde bulgulara göre beyin ağırlığı (A), hippocampus GD bölgesindeki granüler nöron sayısı (B), su tankı testinde ortalama yol uzunluğu (C) çubuk grafikleri karşılaştırıldığında sadece iki parametrenin birbiri ile uyum gösterdiği görülmektedir. Gruplar içinde en az beyin ağırlığı olan 1.grubun öğrenme testlerinde de düşük performansa sahip olduğu görülmektedir.

Gruplar arasındaki farkların istatistiksel açıdan beklenen sonucu vermemesi çalışmamızda kullandığımız sıçan sayısı ile ilgili olabilir. Benzer çalışmalarda kullanılan sıçan sayısı bizim çalışmamızda birkaç kat fazla olduğu halde elde edilen sonuçların benzer olması ve istatistiksel olarak anlamlı bulunması bu varsayımı güçlendirmektedir (217).

Yapılan çalışmalarda tek bir yetişkin sıçanın GD'sinin toplam nöron sayısı 10^6 olarak bulunmuştur (40). Bizim çalışmamızda GD'de tns en fazla ikinci grupta 122.063 olarak bulundu. Seress'e göre ise sıçan GD'sindeki granüler hücrelerin sayısı 635.000 ± 33.000 olarak bulunmuştur (13). Bu sayı hayvanın yaşına, cinsine ve sayma yöntemine göre değişebilir. İnsanların GD nöron sayısı ise Harding ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada sayılmış ve $11,25 (+/-3,12) \times 10^6$ nöron olarak bildirilmiştir (216).

Toplam nöron sayılarının belirtildiği tablo 11'i incelersek ikinci grubun üçüncü gruba göre toplam nöron sayılarında %17'lik bir artış oluşmuştur. Fakat tns açısından 4 grup arasında istatistiksel bir anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,258$). Üçüncü gruba göre 4. grubun tns azalması daha çok beklenirken sadece %1,5 oranında olması iskemi sonrasında artan nörogeneze atfedilebilir (32,218). Birinci grubun 3. gruba göre %8,8 oranında daha az tns ortalamasına sahip olması ÜÇÖ'nün nörogenezi de engelleyen oksidan bir stres yaratmasından ve bu yüzden yeni doğan hücrelerin apoptoza uğramalarını arttırmasından kaynaklanabilir. Çünkü deneysel iskemi tek başına GD'de düşük miktarlarda apoptoz yapar (219).

ÜÇÖ tüketiminin orta yaşlı farelerde hippocampus'un plastisitesini geliştirdiği gösterilmiştir. Bir çalışmada (220) sıçanlarda ÜÇÖ'nün hipoksik-iskemik beyin hasarına etkisi araştırılmış ve ÜÇÖ almış sıçanların hasarlı beyin yarıkürelerinin ağırlık kayıpları, almamışlara nazaran daha az bulunmuştur. Yazawa ve arkadaşları curcumin, tannic asit ve kateşin'in nöroprotektif mekanizmalarını göstermiştir (221). Proantosyanidin bir çalışmada (222) kan glikozunu, lipid peroksidasyonunu, hidrojen peroksit seviyesini ve hippocampus'taki artmış protein sulfidril içeriğini azaltmış ve sıçanlara yapılan bilişsel testlerde yarar sağlamıştır.

Diğer bir çalışmada fare hippokampal hücre kültüründe sadece glutamat verilen örneklerdeki hücrelerin % 15'i hayatta kalabilmiş iken glutamat ve ÜÇÖ verildiğinde bu oran % 23'e çıkmıştır (146). Ayrıca ortalama dendrit uzunlukları da daha fazla ölçülmüştür. Aynı çalışmada hippokampal nöron kültüründeki nöronların dendritlerin morfolojisini ÜÇÖ glutamata karşı koruduğu görülmüştür (146). Başka bir çalışmada (91) sıçan hippokampal nöron kültürüne verilen glutamatın oluşturduğu nörotoksitenin ÜÇÖ ön tedavisi ile proantosyanidin kalsiyum yükselmesini engellemesi sebebiyle azaldığı gösterilmiştir. ÜÇÖ'nün olası mekanizmalarını araştırmak için hücre kültürlerinde western blot tekniği ile kaspaz-3 miktarları ölçülmüştür (146). İlk 30'uncu dakikada kaspaz-3 tüm örneklerde artmış bulunmuştur. 6 saat sonraki ölçümlerde ise ÜÇÖ ve glutamatın beraber verildiği örneklerde kaspaz-3 miktarı normal sınırlarına geri dönmüş iken sadece glutamatın verildiği örneklerde kaspaz-3 düzeyi azalmamıştır. Kaspaz-3 apoptozda çok etkin bir intrsellüler madde olduğu için bu çalışma ÜÇÖ'nün apoptotik yollarda etkin olduğunu gösterir (146). Aynı şekilde ÜÇÖ, kanserli dokuların apoptotik hücre

ölümlerinde de kaspaz-3'ü kullanır (223). 200 mg/kg dozluk ÜÇÖ verilmesi farelere toksisite yapmadan, tümör büyümesinde zaman bağımlı inhibisyon yapmıştır (223).

Namura ve arkadaşları (224) deneysel önbeyin iskemisi esnasında fare hippocampus'unda Erk1/2 fosforilasyonunda ciddi azalma rapor ettiler. Bir çalışma ÜÇÖ'nün hippokampal nöron kültüründe glutamat ile başlatılmış fosforile Erk1/2 seviyelerinin azalmasını hafiflettiği ve dendritlere 30 dakika boyunca glutamat verildiğinde beklenen dendrit çekilmesini önlediğini göstermiştir (146). Erk1/2 fosforilasyonunun artışının hippokampal nöron kültüründe nöronları glutamat ile başlatılan apoptozdan koruması Almeida ve arkadaşları tarafından da doğrulanmıştır (225).

Başka bir çalışmada non-enzimatik bir hücrel antioksidan savunma olan protein sulfidril içeriği hem yetişkin hem de orta yaşlı hayvanlarda ÜÇÖ'ye cevaben artmıştır (124). Aynı çalışmada Sudan Black B ile boyanan yetişkin sıçan nöronlarının sitoplâzmalarında gözlenen lipofuskin benzeri koyu kahverengi birikimlerin ÜÇÖ ile azaldığı gözlenmiştir (124).

ÜÇÖ'nün vücuda yararını sadece tns üzerinden düşünmenin yanlış olduğu düşünülebilir. Çünkü önemli olan hücre sayısında artış değil, artmış hücrelerin normal işlevli halde organizmaya katılabilmesidir. Bu yüzden çalışmamız öğrenme bellek testleriyle desteklenmiştir.

Palmer ve Vanucci tarafından sıçan yavruları üzerinde yapılan HİE deneyinde de uygulanan modifiye Levin modelinin karotis ligasyonu yapılmayan taraftaki beyin hemisferinde ağırlık açısından değişiklik yaratmadığı gösterilmiştir (226). HİE hayvan modellerinde yapılan tek taraflı karotis ligasyonu aynı taraf beyin hemisferlerinde değişik oranlarda doku hasarı ile sonlanmaktadır (220,226,227). Feng ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada HİE uygulanan sıçan yavrularında intraperitoneal enjeksiyonla verilen 25mg-50mg/kg vücut ağırlığı oranında LÜÇÖ'nün beyin hasarında anlamlı bir azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir. Metodolojik olarak bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında adı geçen çalışmada sıçanların HİE uygulamasından 22 gün sonra dekapite edildiği görülmektedir. Davranış testleri yapılmamasının yanı sıra beyin hasarının değerlendirilmesinde skorlama yöntemi kullanıldığı, hasarlı beyin tarafının (karotis ligasyonu yapılan) değerlendirildiği görülmektedir (220,227). Adı geçen çalışmalarda sadece LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan bir kontrol grubunun olmaması da dikkat çekicidir. Bu açılardan bizim çalışmamızda LÜÇÖ verilen HİE'li grubun Feng ve arkadaşlarının bildirdiğinin aksine HİE grubundan daha fazla doku kaybına uğradığı görülmektedir.

Çalışmamızda dekapitasyon işleminin erişkin dönemde yapıldığı dikkate alınır ise uzun dönemde oluşan hasarın, kısa dönemde oluşandan farklı olduğu söylenebilir. Ancak iki çalışma arasındaki farkın nedenini ortaya çıkarmak amacı ile aynı zamanda hem uzun hem de kısa dönem serebral hasarın değerlendirildiği bir HİE çalışması yapıp LÜÇÖ'nün her iki dönem açısından etkisi araştırılabilir. Böylece kısa dönemde olumlu etki yapıyor gibi görünen LÜÇÖ'nün uzun dönemde olumsuz etkili olabileceği yönündeki olasılık netleştirilmiş olacaktır.

SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda vücut ağırlığı ve beyin ağırlığı ortalamaları 3.grupta en yüksek (kontrol), 1.grupta ise en düşük olarak saptandı ($p<0,05$). Morris su tankı testinde yapılan ölçümlerde zaman (escape letency) açısından 1.grubun diğer gruplara göre daha uzun zamana sahip olduğu, bu farkın ikinci ($p=0,012$) ve üçüncü ($p=0,034$) gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Su tankı testinde yol açısından (path length) 1.grubun daha fazla yol uzunluğuna sahip olduğu, bu farkın 2.gruba göre anlamlı olduğu görüldü ($p=0,031$). Su tankı testinde hız (velocity) açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı. Bu son sonuca göre sıçanların motor performansları deneyden etkilenmemiştir. Gyrus dentatus'un granüler tabakasında sayılan toplam nöron sayıları açısından en düşük ortalama 1. grupta saptanırken en yüksek ortalama ise 2. grupta bulundu.

Sonuç olarak hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda ÜÇÖ uygulamasının öğrenme ve bellek üzerinde olumlu bir değişikliğe yol açmadığı ve gyrus dentatus granüler hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yapmadığı saptandı.

KAYNAKLAR

- 1 Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Mini-Review. *J Neurosci Res* 1999; 55: 158–63.
- 2 Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1431-1568.
- 3 Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food* 2003; 6 (4): 291–99.
- 4 Ahn SE, Kim HJ, Jeong I, Hong YJ, Kim MJ, Rhie DJ, et al. Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons. *BMC Neurosci* 2011; 12(78):1-12.
- 5 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M, Çev. Ed. 4. Baskı. Ankara. TÜBA, 2008: 1227-42.
- 6 Klein R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J* 1994; 8: 738-44.
- 7 Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*. 1994; 13(3): 583–94.
- 8 Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 272–80.
- 9 Conner JM, Darracq MA, Roberts J, Tuszynski MH. Nontropic actions of neurotrophins: Subcortical nerve growth factor gene delivery reverses age-related degeneration of primate cortical cholinergic innervation. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98 (4): 1941–46.

- 10 Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996; 383 (6601): 624-27.
- 11 Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 2. Cilt.* Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 1995:403-408.
- 12 Waxman SG. *Korrelatif Nöroanatomi.* Yıldırım M, Çev Ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002: 236-46.
- 13 Seress L, Pokorny J. Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus. A light microscopic and Golgi study. *J Anat* 1981; 133(2): 181-95.
- 14 Abrous DH, Koehl M, Le Moal M. Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. *Physiol Rev* 2005; 85: 523–69.
- 15 Standring S, (Editor-in-chief). *GRAY’S Anatomy. The Anatomical Basis of Clinical Practise.* 40. edition. 2008;Elsevier. Churchill Livingstone. China.347-52.
- 16 Snell RS. *Klinik Nöroanatomi.* Yıldırım M. Çev.Ed.İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2011: 304-316.
- 17 Songur A. Hippocampus. *T Klin Tıp Bil Arş Derg* 2001;21: 427-31.
- 18 Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17(10): 3727–38.
- 19 Kaplan MS, Bell DH. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent - Radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res* 1983; 52: 1-5.

- 20 Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993; 13(6): 2351-58.
- 21 Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; 76(6): 2027-33.
- 22 Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 1988; 72: 399-406.
- 23 Cameron HA, McKay RDG. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001; 435: 406–17.
- 24 Mulders W.H.A.M., West M.J., Slomianka L. Neuron numbers in the presubiculum, parasubiculum, and entorhinal area of the rat. *J Comp Neurol* 1997; 385: 83–94.
- 25 Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AN, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998: 1313-17.
- 26 Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB. Rb and Cdc2 expression in brain: Correlations with 3H-Thymidine incorporation and neurogenesis. *J Neurosci* 1993; 13(7): 2930-38.
- 27 Moser MB. Making more synapses: a way to store information? *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 593–600.
- 28 McEwen BS. Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 255–62.
- 29 Coras R, Siebzehnrubl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, et al. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 2010;133: 3359–72.

- 30 Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 1998; 18(9): 3206–12
- 31 Gould E, Gross CG. Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. *J Neurosci* 2002; 22(3): 619–23.
- 32 Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased Neurogenesis in the Dentate Gyrus After Transient Global Ischemia in Gerbils. *J Neurosci* 1998; 18(19): 7768–78.
- 33 Briones TL, Suh E, Jozsa L, Rogozinska M, Woods J, Wadowska M. Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain Res* 2005; 1033: 51–57.
- 34 Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew Is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1997; 17(7): 2492–98.
- 35 Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999; 19(14): 5792–01.
- 36 McEwen BS. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiat* 2000; 48: 721–31.
- 37 Praag HV, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2: 266 – 70.
- 38 Praag HV, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005; 25(38): 8680–85.
- 39 Danzer SC. Postnatal and Adult Neurogenesis in the Development of Human Disease. *Neuroscientist* 2008; 14(5): 446-58.

40 Markakis EA, Gage FH. Adult-Generated Neurons in the Dentate Gyrus Send Axonal Projections to Field CA3 and Are Surrounded by Synaptic Vesicles. *J Comp Neurol* 1990; 406: 449–60.

41 Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 11879-83.

42 Sun LY, Evans MS, Hsieh J, Panici J, Bartke A. Increased neurogenesis in dentate gyrus of long-lived ames dwarf mice. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1138–44.

43 Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 2002; 69: 745–49.

44 Tanapat P, Galea LAM, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Devl Neuroscience* 1998; 16(3/4): 235-39.

45 Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 1992; 12(9): 3642-50.

46 Ozdemir D, Baykara B, Aksu İ, Kiray M, Sisman AR, Cetin F, Dayi A et al. Relationship between circulating IGF-1 levels and traumatic brain injury-induced hippocampal damage and cognitive dysfunction in immature rats. *Neurosci Lett* 2012; 507: 84– 89.

47 Gilbert ME, Kelly ME, Samsam TE, Goodman JH. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicol sci* 2005; 86(2): 365–74.

48 Tung A, Herrera S, Fornal CA, Jacobs BL. The effect of prolonged anesthesia with isoflurane, propofol, dexmedetomidine, or ketamine on neural cell proliferation in the adult rat. *Anesth Analg* 2008;106: 1772-77.

- 49 Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 97-105.
- 50 Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson P. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999; 39: 569–78.
- 51 Gould E, Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1997; 80(2): 427–36.
- 52 Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 2000; 286: 21-24.
- 53 Robbins SL. *Temel Patoloji*. Çevikbaş U, Çev.Ed, 7.Baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri. 2003:4-31.
- 54 Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17: 3341-49.
- 55 Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008; 6(2): 93 -104.
- 56 Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cerebr Blood F Met* 2005; 25: 1557–72.
- 57 Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson EM, Snider WD, Korsmeyer SJ. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 1996; 17: 401–11.
- 58 Almeida A. Genetic determinants of neuronal vulnerability to apoptosis. *Cell. Moll. Life sci* 2013; 70: 71-88.
- 59 Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* 1997; 4: 429 -34.

- 60 Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57: 1835-40.
- 61 Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185(8): 1481–86.
- 62 Stennicke H, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387 1998; 1387: 17-31.
- 63 Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91(14): 443–46.
- 64 Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9: 459–70.
- 65 Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1081-86.
- 66 Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 1997; 124: 1239-49.
- 67 Macleod KF, Hu Y, Jacks T. Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. *EMBO J* 1996; 15(22): 6178-88.
- 68 Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB rep* 2008: 11-22.
- 69 Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 10432–37.

70 Yazar S, Tunca A. Apoptosis ve Epilepsi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27: 889-93.

71 Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1): 3-15.

72 Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Pete ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1463–67.

73 Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, Legrand EK, et al. The nomenclature of cell death: Recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 484-90.

74 Wachstein M, Besen M. Electron microscopy of renal coagulative necrosis due to dl-serine, with special reference to mitochondrial pyknosis. *Am J Pathol* 1964; 44(3): 383-400.

75 Baker DM, Lamerton AJ. Operative lumbar sympathectomy for severe lower limb ischaemia: still a valuable treatment option. *Ann R Coll Surg* 1994; 76: 50-53.

76 Fuhrman FA, Crismon JM. Studies on gangrene following cold injury. *J Clin invest* 1947:236-44.

77 Loo HW, Yam AKT, Tan TC, Pempg YP, Teoh LC. Severe upper limb complications from parenteral abuse of subutex. *Ann Acad Med Singap* 2005; 34(9): 575-78.

78 Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM. Disseminated Tuberculosis in Interferon gama Gene-disrupted Mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-47.

79 Siddesh G, Girish TU, Manjunath K. Tuberculosis of thyroid gland - A rare case report. *Thyroid Disorders Ther* 2012; 1(1): 1-2.

- 80 Alvarez A, Lacalle J, Cañavate ML, Alonso-Alconada D, Lara-Celador I, Alvarez FJ, Hilario E. Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. In: Méndez-Vilas A, Díaz J, eds. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Volume 2. Formatex Research Center, 2010.
- 81 Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 1978. 9(5): 445-47.
- 82 Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-Ethionine fed with acholine-deficient diet. *Am J Pathol* 1975. 79(3): 465-76.
- 83 Hogge JP, Robinson RE, Magnat CM, Zuurbier RA. The mammographic spectrum of fat necrosis. *Scientific Exhibit* 1995. 15(6): 1347-56.
- 84 Rupi L, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets. *Diabetes* 2002; 51: 1437-42.
- 85 Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-22.
- 86 Busche MN, Pavlov V, Takahashi K, Stahl GL. Myocardial ischemia and reperfusion is dependent on both IgM and mannose-binding lectin. *Am J Physiol-Heart C* 2009; 297: 1853–59.
- 87 Farber JL, El-Mofty SK. The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am J Pathol* 1975;81(1): 237-50.
- 88 Farber J, Chien KR, Mitnacht S. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 1981; 102(2): 271-81.
- 89 Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi - Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 29: 95-100.

- 90 Fanaroff Avroy A, Martin RJ, eds. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant. Volume 1. 6th Ed. section 6. Chapter 37. Part 3-4. USA. Mosby 2005.
- 91 Ahn SH, Kim HJ, Jeong I Hong YJ, Kim M-J, Rhie D-J, et al. Grape seed proanthocyanidin extract inhibits glutamate-induced cell death through inhibition of calcium signals and nitric oxide formation in cultured rat hippocampal neurons. BMC Neurosci 2011; 12(78): 1-12.
- 92 Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J Neurosci 1987; 7(2): 357-88.
- 93 Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflug Arch Eur J Phy 2010; 460: 525–42.
- 94 Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 1987; 7(2): 369-79.
- 95 Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bred DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 6368-71.
- 96 Niggli V, Penniston JT, Carafoli E. Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. J Biol Chem 1979; 254(20): 9955-58.
- 97 Juránek I, Bezek Š. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species – cause or consequence of tissue injury? Gen Physiol Biophys 2005; 24: 263—78.
- 98 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell B 2007; 39: 44–84.

- 99 Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: Relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990; 27(4): 317-25.
- 100 Neyzi O, Ertuğrul T, editörler. *Pediatrici* 1. 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri 1993: 235-41.
- 101 Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD, eds. *Neurology in clinical practise. The neurological disorders. Volume 2. 3rd Ed. USA. Butterworth heinemann* 2000: 1125-66.
- 102 Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson textbook of pediatrics. 16th Ed. USA. W.B.Saunders Company* 2000: 493.
- 103 Roland EH, Poskitt K, Rodriguez E, Lupton BA, Hill A. Perinatal hypoxic-ischemic thalamic injury: Clinical features and neuroimaging. *Ann Neurol* 1998; 44(2): 161-66.
- 104 Jaeschke H, Farhood A, Smith W. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990. 4: 3355-59.
- 105 Granger DN, Stokes KY, Higematsu TS, Cerwinka WH, Tailor A, Krieglstein CF. Splanchnic ischaemia-reperfusion injury: mechanistic insights provided by mutant mice. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 83-91.
- 106 Hehner SP, Breitzkreutz R, Shubinsky G, Unsoeld H, Schulze-Osthoff K, Schmitz ML, Dröge W. Enhancement of T Cell Receptor Signaling by a Mild Oxidative Shift in the Intracellular Thiol Pool. *J Immunol* 2000; 165: 4319-28.
- 107 Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461– 70.
- 108 Kašparová S, Brezová V, Valko M, Horecký J, Mlynárik V, Liptaj T, et al. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem Int* 2005; 46: 601–11.

- 109 Lombardi V, Valko L, Štolc S, Valko M, Ondrejčková O, Horáková L, et al. Free radicals in rabbit spinal cord ischemia: Electron spin resonance spectroscopy and correlation with SOD activity. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(4): 399-412.
- 110 Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 1–14.
- 111 Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-42.
- 112 Devi SA, Jolitha AB, Ishii N. Grape Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monitor* 2006; 12(4): 124-29.
- 113 Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 894–99.
- 114 Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872– 79.
- 115 Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit J Nutr* 2001; 85(2): 67-74.
- 116 Zhao G, Gao H, Qiu J, Lu W, Wei X. The molecular mechanism of protective effects of grape seed proanthocyanidin extract on reperfusion arrhythmias in rats in vivo. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(5): 759-67.
- 117 Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 2006; 160:1–40.
- 118 Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-77.
- 119 Thannickal VJ, Fanburg BL. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor β 1. *J Biol Chem* 1995; 270(51): 30334–38.

- 120 Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol-Lung C* 2000; 279: 1005-28.
- 121 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorrak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
- 122 Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, et al. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 1996; 318: 379-82.
- 123 Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-96.
- 124 Devi SA, Chandrasekar BKS, Manjula KR, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Exp Gerontol* 2011; 46(11): 958–64.
- 125 Cai J, Jones DP. Superoxide in Apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273(19):11401–04.
- 126 Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock CB, et al. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(6): 2680–85.
- 127 McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Bio Med* 1999; 26(7/8): 1034–53.
- 128 Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Rep* 1997; 17(1): 3-8.
- 129 Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, et al. A randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2335-42.

- 130 Farboud Y, Sarkaki A, Badavi M. Preventive effect of grape seed hydroalcoholic extract on dementia type of Alzheimer's disease in aged male rats. *International journal of pharmacology* 2009; (5)4: 257-62.
- 131 Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract* 2006; 60(11): 1484–92.
- 132 Wang H, Race EJ, Shrikhande AJ. Characterization of Anthocyanins in Grape Juices by Ion Trap Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 1839-44.
- 133 Iriti M, Faoro F. Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypotheses* 2006; 67: 833–38.
- 134 Tsang C, Auger C, Mullen W, Bornet A, Rouanet JM, Crozier A, et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Brit J Nutr* 2005; 94: 170–81.
- 135 Dogan A, Celik I. Hepatoprotective and antioxidant activities of grapeseeds against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Brit J Nutr* 2011: 1-7.
- 136 Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res* 2009; 23: 1197–1204.
- 137 Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 622-46.
- 138 Alves de Rezende AA, Graf U, da Rosa Guterres Z, Kerr WE, Spanó MA. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1466–72.

- 139 Wang CZ, Mehendale SR, Yuan CS. Commonly used antioxidant botanicals: Active constituents and their potential role in cardiovascular illness. *Am J Chinese Med* 2007; 35(4): 543–58.
- 140 Prasain JK, Carlson SH, Wyss JM. Flavonoids and age related disease: Risk, benefits and critical windows. *Maturitas* 2010; 66(2): 163–71.
- 141 Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, Agarwal R, Agarwal C. Gallic Acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm Res* 2009; 26(9): 2133–40.
- 142 Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs Lett* 1997; 416: 123-29.
- 143 Cos P, Ying Li, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Poel BV, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998; 61: 71-76.
- 144 Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem* 2010; 120: 599–606.
- 145 Déprez S, Mila I, Scalbert A. Carbon-14 biolabeling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow tree cuttings. *J Agr Food Chem* 1999; 47: 4219-30.
- 146 Narita K, Hisamoto M, Okuda T, Takeda S. Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *Plos One* 2011; 6(1): 1-10.
- 147 Ricardo da Silva MJ, Darmon N, Fernandez Y, Mitjavilat S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J Agr Food Chem* 1991; 39: 1549-52.

148 Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Bio Med* 1999; 27(9/10): 916–21.

149 Bagchi M, Milnes M, Williams C, Balmoori J, Xumei Y, Stohs S, Bagchi D.. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal injury in rats, and the protective ability of a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Nutr Res* 1999;19(8): 1189-99.

150 Aldinia G, Carinia M, Piccolia A, Rossonib G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci* 2003; 73: 2883–98.

151 Balu M, Sangeetha P, Haripriya D, Panneerselvam C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci Lett* 2005; 383: 295–300.

152 Yamaguchi F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Ariga T. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system. *J Agr Food Chem* 1999; 47: 2544-48.

153 Brown L, Kroon PA, Das DK, Das S, Tosaki A, Chan V, et al. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(9): 1513–23.

154 Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Hisamoto M, et al. Grape seed extract acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29: 1121–29.

155 Bastianetto S, Quirion R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 891–97.

- 156 Yoo DY, Kim W, Yoo KY, Lee CH, Choi JH, Yoon YS, et al. Grape seed extract enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in C57BL/6 mice. *Phytother Res* 2011; 25: 668–74.
- 157 Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 572–84.
- 158 Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agr Food Chem* 2002; 50: 6910-16.
- 159 Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agr Food Chem* 2003; 51: 609-14.
- 160 Nakagawa K, Miyazawa T. Chemiluminescence–high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal Biochem* 1997; 248: 41–49.
- 161 Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130(8): 2109-14.
- 162 Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000; 130(8): 2115-19.
- 163 Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. Absorption and urinary excretion of (-)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (-)-epicatechin in rats. *J Agr Food Chem* 2001; 49: 6050-56.
- 164 Piskula MK, Terao J. Accumulation of (0)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998; 128(7): 1172-78.

165 Yang C S, Chen L, Lee M J, et al. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidem Biomar* 1998; 7: 351-54.

166 Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001; 131(6): 1731-37.

167 Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 1999; 129(9): 1662-68.

168 Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 103–08.

169 Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol* 1997; 115: 1405-12.

170 Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46(5): 895-903.

171 King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 867–72.

172 Sharp ES, La Regina MC, Suckow MA, eds. *The laboratory rat*. Washington, DC: CRC Press. 1998.

173 Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Wistar_rat#Wistar_rat Erişim tarihi: 07.01.2013.

174 Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 1983; 5(6): 881-86.

175 Syka J. The Fischer 344 rat as a model of presbycusis. *Hearing Res* 2010; 264: 70–78.

176 Gage R, Björklund A. Cholinergic septal grafts into the hippocampal formation improve spatial learning and memory in aged rats by an atropine-sensitive mechanism. *J Neurosci* 1986; 6(10): 2837-47.

177 Fischer W, Victorin K, Björklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 1987; 329: 65-68.

178 Fischer W, Sirevaag A, Wiegand SJ, Lindsay RM, Björklund A. Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 8607-11.

179 Markowska AL, Price D, Koliatsos VE. Selective effects of nerve growth factor on spatial recent memory as assessed by a delayed nonmatching-to-position task in the water maze. *J Neurosci* 1996; 16(10): 3541-48.

180 Martinez-Serrano A, Fischer W, Soderstrom S, Ebendal T, Björklund A. Long-term functional recovery from age-induced spatial memory impairments by nerve growth factor gene transfer to the rat basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 6355-60.

181 Lindner MD. Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 68: 203–20.

182 O'Steen WK, Spencer RL, Bare DJ, McEwen BS. Analysis of severe photoreceptor loss and Morris water-maze performance in aged rats. *Behav Brain Res* 1995; 68: 151-58.

183 Spencer RL, O'Steen WK, McEwen BS. Water maze performance of aged Sprague-Dawley rats in relation to retinal morphologic measures. *Behav Brain Res* 1995; 68: 139-50

- 184 D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36: 60–90.
- 185 Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, et al. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M2-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired rats. *J Neurosci* 1995; 15(2): 1455-62.
- 186 Chen KS, Masliah E, Mallory M Gage FH. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience* 1995; 68(1): 19-27.
- 187 Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth* 1984; 11: 47-60.
- 188 Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, Gal B, Aivar P, Uzategui YG, et al. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *Plos One* 2011; 6(7): 1-16.
- 189 Lindner MD, Dworetzky SI, Sampson C, Loy R. Relationship of APP mRNA transcripts and levels of NGF and low-affinity NGF receptors to behavioral measures of age-related cognitive dysfunction. *J Neurosci* 1994; 14(4): 2282-89.
- 190 Barnes RH, Cunnold SR, Zimmermann RR, Simmons H, Macleod RB, Krook L. Influence of nutritional deprivations in early life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. *J Nutr* 1966; 89(4): 399-410.
- 191 Odacı E, Yıldırım Ş, Bahadır A, Canan S, Şahin B, Baş O, et al. Yeni stereolojik yöntemlerin olası hata kaynakları ve çözüm yolları. *T Klin J Med Sci* 2004; 24:78-87.
- 192 Mayhew TN, Burton GJ. Stereology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. *Microsc Res Techniq* 1997; 38: 195–205.
- 193 Mandarim-De-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75(4): 469-86

194 Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J Microsc* 1999; 193(3): 199–211.

195 Hosseini-Sharifabad M, Nyengaard JR. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Meth* 2007; 162: 206–14.

196 Coggeshall RE, Lekan HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 1996; 364: 6-15.

197 Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966; 30: 23-38.

198 Pakkenberg B, Møller A, Gundersen H J G, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosur PS* 1991;54: 30-33.

199 Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 1996; 188: 1-15.

200 Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: Parçalama. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002; 22: 30-46.

201 West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 1999; 22(2): 51-61.

202 West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.

203 Roberts N, Puddephat MJ, McNulty V. The benefit of stereology for quantitative radiology. *Brit J Radiol* 2000; 73: 679-97.

204 Adigüzel E, ve ark. Hipoksik-iskemik beyin hasarı modeli uygulanan yeni doğan sıçanlarda üzüm çekirdeği özütü'nün öğrenme-bellek ve hipokampus' un histolojik yapısı üzerine etkisi. Tübitak. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı. 2012. Proje raporu 1001-108S157.

205 Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36: 1-17.

206 Yonguç GN. Sıçanlarda streptozosin ile oluşturulan deneysel diyabetin uzaysal öğrenme ve hippocampus nöron sayısına etkisi. Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültes Anatomi Anabilim Dalı,2009.

207 Adigüzel E, Düzcan SE, Akdoğan I, Tufan AÇ. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003; 2: 6-8.

208 Korkmaz A, Tumkaya L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. *J. Microscopy* 1997; 187: 104-09.

209. Gokcimen A, Rağbetli MÇ, Baş O, Tunc AT, Aslan H, Yazici AC, Kaplan S. Effect of prenatal exposure to an anti-inflammatory drug on neuron number in cornu ammonis and dentate gyrus of the rat hippocampus: A stereological study. *Brain Res* 2007; 1127: 185–92.

210 Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* 1991; 26(1): 61-67.

211 Wang XL, Zhao YS, Yanga YJ, Xiea M, Yua XH. Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic–ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res* 2008; 1222: 87–94.

- 212 Mishima K, Ikeda T, Aoo N, Takai N, Takahashi S, Egashira N, et al. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett* 2005; 376:194–99.
- 213 Squire LR, *Memory and Brain*. New York, Oxford.1987.
- 214 Biran V, Verney C, Ferriero DM. Perinatal Cerebellar Injury in Human and Animal Models. *Neurol Res Int* 2012; 2012: 1-27.
- 215 Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2003; 145(1–2): 209-19.
- 216 Harding AJ, Halliday GM, Krill JJ. Variation in hippocampal neuron number with age and brain volume. *Cereb Cortex* 1998; 8: 710-18.
- 217 Ikeda T, Mishima K, Aoo N, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T. Combination treatment of neonatal rats with hypoxia-ischemia and endotoxin induces long-lasting memory and learning impairment that is associated with extended cerebral damage. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 2132-41.
- 218 Briones TL, Suh E, Jozsa L, Rogozinska M, Woods J, Wadowska M. Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain Res* 2005; 1033: 51– 57.
- 219 Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N. Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 1999; 83: 283–87.
- 220 Feng Y, Liu YM, Leblanc MH, BhattAJ, Rhodes PG. Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61(3): 295-300.

221 Yazawa K, Kihara T, Shen H, Shimmyo Y, Niidome T, Sugimoto H. Distinct mechanisms underlie distinct polyphenol-induced neuroprotection. *Febs Lett* 2006; 580: 6623–28.

222 Devi SA, Chandrasekar BKS, Manjula KR, Ishii N. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Exp Gerontol* 2011; 46: 958–64.

223 Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6194-02.

224 Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, et al. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(20): 11569–74.

225 Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1329–43.

226 Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990; 27: 332–36.

227 Feng Y, Liu YM, Fratkins JD, LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull* 2005; 66: 120–27.