



Hipoksik-İskemik Beyin Hasarı Modeli Uygulanan Yeni Doğan Sıçanlarda Üzüm Çekirdeği Özütü'nün Öğrenme-Bellek ve Hipokampus'un Histolojik Yapısı Üzerine Etkisi

Proje No: 108S157

Prof. Dr.Esat Adıgüzel
Doç.Dr. M. Bülent Özdemir
Doç.Dr. Yusuf Yılmaz
Prof.Dr. Gülçin Abban
Prof.Dr. İzzettin Hatip
Prof.Dr. Gülgün Şengül

KASIM 2012
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Üzüm, insanlık tarihinin her aşamasında var olan meyvelerden biri olma özelliğini taşımaktadır. Bilim tarihinde de beyin fonksiyonlarına duyulan merakın aynı ölçüde eski, ancak hala güncel olduğunu söylemek mümkündür. Bu proje ile iki konu bilimsel araştırma ortamına taşınmıştır. Birincisi üzüm çekirdeğinin antioksidan etkisi, diğeri ise beyin fonksiyonlarından öğrenme ve belleğin anatomik yapılarıdır. Her iki konu da dünyada en çok araştırılan konular arasında yer almaktadır. Ticari kaygılardan uzak olarak, bu çalışma içinde üzüm çekirdeğinin in vivo etkisi ve sonuçları in vitro etkilerle karşılaştırılarak araştırıldı. Beyin araştırmalarında en çok konu edilen yapılardan hippocampusun tabakaları incelenerek hem patolojik değişiklikleri açıklayacak, hem de beynin öğrenme ile ilgili yapılarının fonksiyonlarına ışık tutacak bilgilere ulaşıldı. Ülkemizde gıdadan sağlığa uzanan ara basamaklarda yapılacak olan temel araştırma çalışmalarına katkı sunacak olan bu projenin sonuçları yeni araştırmalarla geliştirilmeyi beklemektedir. Bilimsel deneyin olmaz ise olmazı olan tekrarlanabilirlik kapısı da açıktır. Büyük zahmetlerle elde edilen bu sonuçların daha ileri çalışmalara yol gösterici olması en büyük beklentimizdir.

Bu çalışma süresinde ve daha öncesinde gerek laboratuvar olanaklarını gerek ise en geniş bilgisini karşılıksız bize sunan Prof.Dr. George Paxinos'a (Neuroscience Research Australia, Sydney) tüm destekleri için minnettarız. Laboratuvar çalışanlarımız Veteriner Hekimi Barbaros Şahin ve Laborant Erdiç Karataş emekleri ile bu projeye destek oldular. Projenin Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (2008 TPF 005) ve TÜBİTAK (108 S 157) tarafından desteklenmesi, bilimsel açıdan bağımsız bir çalışma ortaya konulmasını sağladı. Bu açıdan bütün proje personeli her iki kuruma ve destekleyen çalışanlara teşekkürlerini sunar.

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ve ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ	4
SİNİR DOKUSU ve MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ	8
SİNİR HÜCRESİNİN İSKEMİ ve HİPOKSİYE DUYARLILIĞI	10
HİPOKSİ-İSKEMİNİN ÖZELLİKLERİ VE BEYİN DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ	11
STEREOLOJİK YÖNTEMLER VE OPTİK PARÇALAMA	18
GEREÇ VE YÖNTEM	24
ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ İLE İLGİLİ İŞLEMLER	24
Üzüm Çekirdeği Özütü İçin Kaynak Seçimi	24
Ektraksiyon ve Liyofilizasyon	24
Verimlilik ve Fenolik Madde Tayini	25
Ferrik Demir İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Tayini	25
Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Analiz İle Tayini	26
LÜÇÖ'NÜN İN VİTRO VE İN VİVO OKSİDAN Ve ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN GÖSTERİLMESİ	26
H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Krokin Çözeltisi Renginin Ağarması Üzerine Etkisi	26
LÜÇÖ'nün Eritrosit Deformabilitesi Üzerine Etkisi	27
LÜÇÖ'nün Sıçan Serum ve Beyin Dokusunda Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status (TAS, TOS) Üzerine Etkisi	27
HİPOKSİ-İSKEMİK ENSEFALOPATİ (HİE) MODELİ	28
HAZIRLIK UYGULAMALARI (Deneyin Ön Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar, LÜÇÖ Uygulama Rejiminin Saptanması)	28
Yavru Sıçanların Elde Edilmesi	29
Yavru Sıçanlara LÜÇÖ Enjeksiyonu ve HİE Uygulanması	30
ÖĞRENME TESTLERİNİN UYGULANMASI	30
Morris Su Tankı Testi'nin Uygulanması	30
Sekiz Kollu Labirent Testi (The Radial Eight-Arm Maze) Uygulanması	33

PERFÜZYON, DEKAPİTASYON, KRANYOTOMİ VE DONDURMA- KESME İŞLEMLERİ	35
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE HİPOCAMPUS CA3-2 TABAKASINDA PYRAMİDAL HÜCRE SAYIMI	36
Sistemik Rastgele Örnekleme Stratejisinin Planlanması ve Kesit Örnekleme Oranı	36
İmmunohistokimyasal ve Histokimyasal Boyama Yöntemleri	36
Tarafsız Sayım Çerçevesi ve Optik Disektörün Uygulanması	37
Optik Parçalama (Fraksiyonlama) Yönteminin Uygulanması	38
Kesit Kalınlığının Ölçümü ve Kesit Kalınlığı Örnekleme Oranı (KKÖO)	38
Toplam Hücre Sayısının Hesaplanması	39
İMMUN BOYANMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ	40
İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	41
BULGULAR	42
LÜÇÖ ELDE EDİLMESİ, İÇERİK VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ	42
Ekstraksiyon Verimliliği ve Fenolik Madde Tayini	42
Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Analiz ile Tayini	43
H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Krokin Çözültisi Renginin A ğarması Üzerine Etkisi	43
LÜÇÖ'nün In Vitro ve In Vivo Antioksidan Etkinliği	47
ÖĞRENME TESTLERİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR	48
Morris Su Tankı Testi (Water Maze) Bulguları	48
Sekiz Kollu Labirent Testi (The Radial Eight Arm Maze) Bulguları	51
BEYİN AĞIRLIĞI AÇISINDAN GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI	54
SAĞ HİPOCAMPUS CA3-2 ALANLARINDAKİ TOPLAM PYRAMİDAL HÜCRE SAYILARI	56
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BOYALI KESİTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	59
TARTIŞMA	66
Sonuç ve öneriler	76
KAYNAKLAR	78
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	87

Şekil 1: Flavonoidlerin sınıflandırılması.	5
Şekil 2: Flavanoid yapısı ve bulunuşu	6
Şekil 3: Lee ve ark. makalesinden alınan bu şemada kırmızı oklar ile gösterilen yolakta beyin dokusunda iskemi ile uyarılmış hücre ölü mü şematize edilmektedir	13
Şekil 4: Deneysel olarak t-buty l hydroperoxide (tBOOH) ile indüklenmiş hücre ölümünün şematik açıklaması	15
Şekil 5: Reactive oxygen species (ROS) ile uyarılmış apoptozun şematize edilmiş süreci	16
Şekil 6: İki boyutlu kesitlerle yapılan örnekleme lerde ortaya çıkan boyut azalması (103).	19
Şekil 7: Tarafsız sayım çerçevesi	20
Şekil 8: Biyolojik kesitlerde ortaya çıkan fazla sayıdaki kesit görüntüsü	21
Şekil 9: Optik parçalama yöntemi ile sıç an hipokampusunda pyramidal nöron sayısının hesaplanması.	22
Şekil 10: Genel anestezi altındaki sıç an yavrusuna sol a.carotis communis ligasyonunun uygulanması.	31
Şekil 11: Su tankı testinde kullanılan havuzun şematik görünümü.	32
Şekil 12: Bir sıç anın testin başında ve sonunda platformu bulmak için kat ettiği yol.	33
Şekil 13: Sekiz kollu labirent testinde kullanılan malzeme ve ekipmanlar	34
Şekil 14: Bilgisayar ekranından alınan bu görüntüde solda kamera kaydı	35
Şekil 15: Tarafsız sayım çerçevesi	37
Şekil 16: SHTEREOM [®] yazılımında hücre sayım modülünün	39
Şekil 17: Epikateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 18: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'ye ait kromatogram	43
Şekil 19: Metanol içerisinde hazırlanan ve fosfat tamponu (pH 7) ile seyreltilen krokin çözeltilisine su ve %30'luk hidrojen peroksit ilavesinin etkisi	44
Şekil 20: Saf su ilave edilmiş (150µL) krokin çözeltilisinin 5 farklı zamanda elde edilmiş spektrumu.	45
Şekil 21: Yüzde 30'luk hidrojen peroksit ilave edilmiş (150µL) krokin çözeltilisinin 6 farklı zamanda elde edilmiş spektrumu.	45
Şekil 22: Hidrojen peroksitin spektrumu.	46
Şekil 23: Krokin çözeltilisine ilave edilen 150µL su, hidrojen peroksit veya LÜÇÖ'nün absorbans üzerine etkisi.	46

Şekil 24: 0,95 kayma hızında eritrosit deformabilitelerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği.	47
Şekil 25: 1,69 kayma hızında eritrosit deformabilitelerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği.	47
Şekil 26: Sıçanın platforma ulaşması için geçen zaman açısından (Escape Latency, saniye) grupların karşılaştırılması	50
Şekil 27: Deneğin platforma ulaşması için kat ettiği yol (Path Length, cm) açısından grupların karşılaştırılması	51
Şekil 28: Ortalama hız (Velocity, cm/sn) açısından karşılaştırılması	52
Şekil 29: Doğru sayısı ortalamalarının çubuk ve çizgi grafiği.	53
Şekil 30: Kol hatası ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafikleri	53
Şekil 31: Toplam hata ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafiği.	54
Şekil 32: Testi tamamlama sürelerinin ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafikleri.	54
Şekil 33: Beyin ve vücut ağırlık ortalamalarının çubuk grafik ile gösterilmesi.	56
Şekil 34: Beyinlerdeki makroskopik değişiklikler ile ilgili resimler	57
Şekil 35: Birinci gruba ait bir sıçanda görülen yoğun doku kaybı ve kistleşme	57
Şekil 36: Gruplara ait sağ hipokampus CA3-2 alanlarındaki toplam piramidal nöron sayısı ortalamalarını gösterir çubuk grafik	58
Şekil 37: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında parvalbumin + piramidal hücre oranı ortalamalarının grafiği	59
Şekil 38: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında parvalbumin + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu	60
Şekil 39: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında NeuN + piramidal hücre oranı ortalamalarının grafiği	62
Şekil 40: NeuN + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından H-Score karşılaştırması	63
Şekil 41: Hipokampus CA3-2 alanlarına ait 10X büyütmede mikroskop görüntüleri	64
Şekil 42: Parvalbumin sentezi açısından immunohistokimyasal olarak boyanmış hipokampus horizontal kesiti	65
Şekil 43: Çin'de yetiştirilen üzümde yapılan fenolik madde miktarı tayini	68
Şekil 44: Saffrondan saflaştırılmak suretiyle elde edilen krokin çalışması	69
Şekil 45: İnsan ve sıçan fetüsündeki dönemsel özellikler karşılaştırılmaktadır	71
Şekil 46: Beyin ağırlığı, piramidal nöron sayısı ve öğrenme testleri	73
Şekil 47: Calretinin boyalı hipokampus kesiti görüntüleri	75

Tablo 1: Flavanol' lere ait kimyasal yapı ve oligomerleri.	7
Tablo 2: Kromatografik analizlerde kullanılan gradiyen program.	26
Tablo 3: SHTEREOM [®] programı yardımı ile elde edilmiş, bir sıçana ait veriler	40
Tablo 4: Pekmez atığı üzüm çekirdeklerinde fenolik madde miktarı	42
Tablo 5: Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Üzüm Çekirdeklerinin Ortalama Fenolik Madde İçerikleri	42
Tablo 6. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'nün gallik asit, kateşin ve epikateşin içerikleri	44
Tablo 7: LÜÇÖ'nün antioksidan etkinliğinin plazma ve beyin dokusunda gösterilmesi	48
Tablo 8: Grupların plazma ve beyin dokusunda TAS, TOS değerleri, karşılaştırma sonuçları	49
Tablo 9: Yedi günlük intraperitoneal LÜÇÖ enjeksiyonu sonrası beyin (hipokampus) dokusunda TAS, TOS değeri ortalamaları	49
Tablo 10: Morris su tankı testi (Morris Water Maze) sonuçları	50
Tablo 11: Davranış testi verilerinin ortalama, standart hata olarak gruplara dağılımı	52
Tablo 12: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamaları.	55
Tablo 13: Gruplara ait sağ hipokampus CA3-2 alanlarındaki toplam piramidal nöron sayısı ortalamalarını gösterir tablo	58
Tablo 14: Hipokampus CA3-2 alanlarında parvalbumin + piramidal hücre oranını (%) gösteren tablo	59
Tablo 15: Hipokampus CA3-2 bölgelerindeki parvalbumin + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından hesaplanan H-SCORE değerlerini gösteren tablo	60
Tablo 16: Hipokampus CA3-2 alanlarında NeuN+ piramidal hücre oranını (%) gösteren tablo.	61
Tablo 17: Hipokampus CA3-2 bölgelerindeki NeuN + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu	62

Kısaltmalar

LÜÇÖ: Liyofilize üzüm çekirdeği özütü

ÜÇÖ (UCO): Üzüm çekirdeği özütü

HİE: Hipoksik İskemik Ensefalopati

CE: Hata katsayısı (coefficient of error)

KKÖ: Kesit kalınlığı örnekleme oranı

KÖO: Kesit örnekleme oranı

AÖO: Alan örnekleme oranı

TAS: Total antioksidan status

TOS: Total oksidan status

OSİ: Oksidan stres indeksi

TNN: Toplam hücre sayısı

Özet

Başlık: Hipoksik-İskemik Beyin Hasarı Modeli Uygulanan Yeni Doğan Sıçanlarda Üzüm Çekirdeği Özütü'nün Öğrenme-Bellek ve Hipokampus'un Histolojik Yapısı Üzerine Etkisi

Amaç:

Bu çalışmada üzüm çekirdeği özütünün yenidoğan sıçanlarda hipoksik iskemik ensefalopati modeli ile oluşturulan beyin hasarında koruyucu etkisi olup olmadığı araştırıldı. Öğrenme ve bellek fonksiyon kaybı ile hipokampus piramidal nöron sayıları arasındaki ilişki araştırıldı.

Gereç, yöntem:

Denizli yöresi sezon ürünü üzümün pekmez atığı olan çekirdeklerden liyofilize üzüm çekirdeği özütü hazırlandı. Özütün antioksidan özelliği ve fenolik bileşik içeriği saptandı. Erişkin sıçanlarda enjeksiyonla özüt verilerek plazmada ve beyin dokusunda antioksidan kapasite ölçüldü. Hipoksik iskemik ensefalopati deneyi için kullanılan yenidoğan sıçan yavruları dört gruba ayrıldı. 1.Grup: hipoksik iskemi modeli uygulanarak liyofilize üzüm çekirdeği özütü (cilt altı enjeksiyonu) ile tedavi edildi, 2.Grup: üzüm çekirdeği özütü ile tedavi edildi, 3.Grup: sağlıklı kontrol, 4.Grup: Hipoksik iskemi modeli uygulandı. Sıçanlar erişkin hale gelince su tankı ve sekiz kollu labirent öğrenme testleri uygulandı. Çıkarılan beyinler tartıldı ve histopatolojik değerlendirmeye alındı. Sağ hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde stereolojik yöntemlerle (optik parçalama) piramidal nöron sayımı yapıldı. Hücre gruplarının hasardan etkilenme derecelerini saptamak için immunohistokimyasal yöntemlerle kalsiyum bağlayan protein boyaları yapıldı (Parvalbumin, NeuN). İmmunopozitif hücreler H-Score Hesaplaması yapılarak değerlendirildi.

Bulgular:

Elde edilen liyofilize üzüm çekirdeği özütünün literatürde bildirilen örnekler düzeyinde antioksidan maddeler içerdiği gösterildi. Cilt altı özüt enjeksiyonunun sıçan plazmasında antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı ($p<0,05$) beyin dokusunda ise değişikliğe yol açmadığı saptandı ($p>0,05$). Su tankı testinde 1.Grubun diğer gruplara göre en kötü performansa sahip olduğu görüldü. Sekiz kollu labirent testinde 4.Grubun performansı diğer gruplara göre daha düşüktü ($p<0,05$). Beyin ağırlığı ortalaması bakımından 1.Grubun en düşük ağırlığa sahip olduğu saptandı ($p<0,05$). Sağ hipokampus CA3-2 bölgelerinde piramidal nöron sayısı bakımından gruplar arasında fark saptanmadı. Parvalbumin pozitif hücrelerin 1.Grupta arttığı, NeuN pozitif hücrelerin ise azaldığı saptandı. (her iki parametre için $p<0,05$).

Sonuç:

Liyofilize hale getirilen üzüm çekirdeği özütünün antioksidan madde içeriğinin yüksek olduğu gösterildi. Cilt altı enjeksiyonla uygulanan üzüm çekirdeği özütünün hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan yavrularında uzun dönemde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamadığı, hipokampus CA3-2 bölgesi piramidal nöronlarda parvalbumin pozitif hücrelerde artışa, NeuN pozitif hücrelerde azalmaya neden olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: vitis vinifera, parvalbumin, NeuN, hipokampus, piramidal nöron, yenidoğan

Abstract

Title: Effects of grape seed extract on histological structure of hippocampus and learning-memory in the hypoxic-ischemic neonatal rats

Aim:

In this study, the grape seed extract was investigated that it has whether protective effect on induced brain injury in hypoxic ischemic encephalopathy model of neonatal rat.

Relationship between the number hippocampal pyramidal neurons and memory dysfunction was investigated.

Materials, methods:

Freeze-dried grape seed extract was produced from byproduct of grape juice from seasonal grapes of the Denizli region. Antioxidant properties and phenolic content of the extract was determined. Antioxidant capacities in plasma and brain tissue were measured in the extract injected adult rats. The newborn rats used to establish the hypoxic ischemic encephalopathy model were divided into four groups; Group 1: hypoxic ischemic encephalopathy was performed and treated by freeze-dried grape seed extract (subcutaneous injection); Group 2: treated by grape seed extract, Group 3: healthy controls, Group 4: hypoxic ischemia model was performed. Learning tests of the water maze and eight-arm maze were performed after the rats become adult. The removed brains were weighed and evaluated about histopathological changes. The pyramidal neurons of CA3-2 sub-regions of the right hippocampus of the rats were counted by the stereological methods (optical fractionator). Immunohistochemical methods to stain calcium-binding protein (Parvalbumin, NeuN) were performed to determine the degree of damage of affected neuron cell groups. Immunopositive cells were evaluated by H-Score calculation.

Results:

It is shown that the produced freeze-dried grape seed extract contained antioxidant substances at the level of that reported in the literature. Subcutaneous injection of the extract significantly increased the antioxidant capacity of plasma of rats ($p < 0.05$), but there was no changes in brain tissue ($p > 0.05$). Water maze performance of Group 1 was the worst in the groups. The eight-arm maze performance of Group 4 was significantly lower than the other groups ($p < 0.05$). The means of the brain weight was the lowest in Group 1 ($p < 0.05$). There was no difference between the groups the total number of right hippocampal pyramidal neurons in CA3-2 area. H-Score of parvalbumin-positive cells were higher, and the NeuN positive cells were lower in 1. Group then those of the others ($p < 0.05$ for two parameter).

Conclusion:

Freeze-dried grape seed extract has been shown to have a high content of antioxidant substances. Subcutaneous injection of the grape seed extract did not provide a significant improvement compared with the control group in the long term. It was shown that freeze-dried grape seed extract injection in rat pups subjected to hypoxic ischemic encephalopathy caused to increase in parvalbumin-positive pyramidal neurons, to decrease in NeuN-positive pyramidal neurons in right hippocampal CA3-2 areas.

Key words: vitis vinifera, Parvalbumin, NeuN, hippocampus, pyramidal neurons, neonatal

GİRİŞ

Beyin araştırmaları günümüzün en yaygın araştırma alanlarından birisidir. Bu konu gerek sinir sistemi fonksiyonlarının çözümlenmesi, gerek ise sinir sistemini ilgilendiren hastalıklara tedavi olanakları yaratılması açısından bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Perinatal dönemde serebral iskemik olayların 2-4/1000 doğum olacak kadar yaygınlığa ulaştığı göz önüne alındığında bu ilginin nedeni anlaşılabilir (VANNUCCI, 2000). Yenidogan hipoksik iskemik ensefalopatisi (HİE) ülkede ülkeye değişen bir prevalansa sahiptir. İspanya’da yapılan çalışmada HİE görülme sıklığı 0,49/1000, İzlanda’da ise 1,4/1000 olarak bildirilmiştir (GARCÍA-ALIX, 2009; PALSDOTTIR, 2007).

Doğum sırasında oluşan hipoksi ve iskeminin yol açtığı beyin hasarı, yeni doğan ölümleri ve nörolojik hasarların başlıca nedenlerindedir. Erken doğum ve doğum sırasında oluşan kordon dolanması, aspirasyon gibi olaylar ölüm ve beyin hasarı gelişimini artırmaktadır, yaşayan bebeklerde de %25-30 oranında zekâ geriliği, üst motor nöron tipi felçler, öğrenme zorluğu gibi sekeller görülmektedir (VANNUCCI, 2000; GARCÍA-ALIX, 2009; PALSDOTTIR, 2007; STOLL, 2004).

Bu hasarın oluşumuna oksijen eksikliği ile ortaya çıkan oksidan maddelerin lipid, protein ve polisakkaritlerin oksidasyonu ve DNA hasarı yaparak yol açtığı bilinmektedir (BUONOCORE, 2001). Tedavi ve ya koruma amacıyla antioksidan maddeler üzerinde yapılan çalışmalar oldukça yaygındır. Antioksidanlar ticari müstahzar olarak (E vitamini gibi) elde edilebileceği gibi, henüz araştırma seviyesinde olan, tam tanımlanmamış maddeler de kullanılmaktadır.

Antioksidan maddelerin serbest radikalleri yakalayarak hipoksik iskeminin oluşturduğu tabloyu düzeltebildiği gösterilmiştir (VOLPE, 2001). Üzüm çekirdeği de bu maddelerden biridir. Üzüm çekirdeğinden elde edilen ürünler içerik olarak elde edildiği dönem ve şartlar altında oldukça değişkenlik gösterir. Günümüzde tüketimi özendirilen üzüm, kabuğunda ve çekirdeğinde bulunan flavonoidler (catechin, epicatechin, procyanidins and anthocyanins), fenolik asitler (gallic and ellagic acids) ve stilbenler sayesinde kuvvetli bir antioksidan etkiye sahiptir (YILMAZ, 2006). Bu maddelerin etkin serbest radikal temizleyici olduğu, miyokard infarktüsüne karşı koruduğu, ateroskleroza azalttığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (DA SILVA, 1991; SATO, 1999; YAMAKOSHI, 1999; FENG, 2005). Üzüm çekirdeği özütünün, vücut ağırlığına göre eşit dozlarda alınan C ve E vitaminleri ile karşılaştırıldığında daha üstün antioksidan etki sağladığı öne sürülmektedir (BAGCHI,

1997). Üzüm çekirdeği özütünün, yenidoğan sıçan hipoksik-iskemik ensefalopati modelinde lipid oksidasyonunu baskıladığı ve beyin hasarını azalttığı, dolayısı ile sinir hücrelerini koruyucu etkisi olduğu savunulmuştur (FENG, 2005). Bu ve benzeri antioksidan amaçla kullanılan bitki türevi ürünlerin yararları, zararları, dozları ve etki mekanizmaları konusunda *in vivo* ortamda yapılmış araştırma ve bilgi oldukça sınırlıdır (PRASAINA, 2010). Yenidoğan HİE modelinde de öğrenme, bellek ve hipokampus piramidal hücre tabakası üzerine üzüm çekirdeği özütünün etkilerini uzun dönemde inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Hipokampusun öğrenme ve yeni bellek oluşumunda rol aldığı bilinmektedir (COHEN, 1993). İnsanlarda ve hayvanlarda oluşan hipokampus lezyonları, bilgilerin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılmasında çeşitli sorunlara yol açar (SQUIRE, 1987). Bellek oluşması ile ilgili mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalarda hipokampus ilgi odağı haline gelmiştir. Hipokampus serebrumun kortikal yapılarından olmasının yanında üç tabakalı yapısı ile dikkat çeker. Burada bulunan sinir hücreleri iki ana gruba ayrılabilir; temel nöronlar (piramidal nöronlar) ve diğer nöronlar. Temel ve diğer nöronlar yapısal özelliklerine göre kimyasal işaretleyiciler ile ayırt edilebilirler (NOMURA, 1997). Bu nöron gruplarının da kendi içinde farklılıkları söz konusudur. Üç tabakalı yapı içinde ayrı özellikler gösteren tabakalanmalar görmek mümkündür. Bundan dolayı hipokampus yapılarının fonksiyonel ve morfolojik özellikleri üzerine yapılan araştırmalar halen güncelliğini korumaktadır.

Bu bilgiler altında hazırlanan bu araştırma projesi iki ana konu üzerine planlandı:

- Üzüm çekirdeğinden elde edilecek özütün antioksidan özelliklerinin *in vivo* ortamda araştırılması
- Yenidoğanın hipoksik-iskemik ensefalopatisinde hipokampustaki hücre kaybının, bellek hasarının özellikleri ve önlenebilirliğin yanı sıra hipokampus yapısı ve fonksiyonu açısından hücre gruplarının özelliklerinin araştırılması.

In vivo yapılan temel araştırmaların bir basamağı da deneysel hayvan modelleridir. Bu konuda geliştirilmiş olan deney modelleri, hastalık bazında belirli hasarları taklit edecek şekilde planlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın olanları sıçanlar üzerinde geliştirilmiştir. Burada konu olan iskemi ile ilgili modeller fokal iskemik olaylardan, genel iskemik olaylara kadar uzanan geniş bir hasar taklidini içermektedir. Her araştırmanın hipotezine yönelik modifiye deney modelleri denenmektedir. Bu çalışmada da yeni doğan sıçanların genel hipoksik iskemik beyin hasarını taklit eden modifiye Levin modeli uygulandı (LEVINE, 1960). Yenidoğan döneminde oluşan hasarın ileri yaşlardaki etkilerinin gözlenebilmesi için hayvanlar erişkin oluncaya kadar beklenerek, modifiye bir deney gerçekleştirildi.

Toplumsal ekonomiye katkı ve gelişim sağlamak amacıyla, ticari olarak bulunan üzüm çekirdeğinden üretilmiş müstahzarlar yerine, yöresel olarak üretilen üzümlerin çekirdeklerinden proje ekibi tarafından elde edilen özüt kullanıldı.

Bu araştırma açısından üç hipotez öne sürüldü:

1. Hipotez: Hipokampusu ait hücre grupları hipoksik-iskemiye aynı ölçüde duyarlı değildir.

2. Hipotez: Üzüm çekirdeği içerdiği antioksidan özelliği sayesinde hipokampusdaki hipoksik-iskemik hasarı azaltır.

3. Hipotez: Hipokampustaki hücre gruplarının sayısal olarak hipoksik iskemiden etkilenme düzeyleri ile öğrenme ve bellek fonksiyonu arasında ilişki vardır.

Bu hipotezleri kanıtlamak için öğrenme ve belleğin oluşumunda görev alan yapılardan hipokampusun hücre gruplarının immunohistokimyasal özelliklerinden yararlanarak hipoksik-iskemiye karşı duyarlılık farkları gösterildi. Antioksidan olduğu kabul edilen üzüm çekirdeği özütünün hipoksik-iskeminin meydana getirdiği olumsuz süreçten koruyucu etkisi sınıandı. Deneyin etkileri öğrenme ve bellek açısından Morris su tankı ve sekiz kollu labirent testleri ile ölçüldü (MORRIS, 1981; OLTON, 1976). Histopatolojik değerlendirmede stereolojik yöntemler ve H SCORE değerlendirmesi uygulandı (ERSOY, 2009; WEST, 1991). Burada hipoksik-iskemi modeli hedef yapıda hasar meydana getiren hastalıkları, üzüm çekirdeği ise hasarı engellemek için kullanılan ilaçları temsilen kullanıldı.

Elde edilen bulgular literatür bilgileri ışığında üzüm çekirdeğinin antioksidan özellikleri, hipoksik iskeminin beyin hasarı oluşturma özellikleri ve hipokampus yapısal özellikleri açısından tartışıldı.

GENEL BİLGİLER

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ve ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Serbest radikallerin hücre üzerindeki olumsuz etkilerinin fark edilmesi ile serbest radikal yakalayıcı moleküllerin araştırılmaya başlandığı söylenebilir (BAGCHI, 2000). Üzüm çekirdeği, zengin polifenol içeriği nedeni ile bu araştırmalara konu olmuştur. Aynı zamanda, üzümde elde edilen şarap, pekmez ve şıra gibi ürünlerden artan üzüm kabuğu ve çekirdeğinin ticari olarak değerlendirilmesi kaygısının, bu ürünlerin araştırma konusu olmasında katkısı olabilir.

Serbest radikaller günümüzde artrit, hemorajik şok, ateroskleroz gibi hastalıklardan iskemi- reperfüzyon hasarına kadar yüzlerce hastalığın oluşmasındaki mekanizmalarda yer almaktan sorumlu tutulmaktadır. Antioksidanların ise bu hastalık süreçlerini olumlu yönde engelleyeceği veya geri çevireceği beklentisi vardır. Bu amaçla, *in vitro* ortamda serbest radikal bağlayıcı olarak bilinen ve meyve, sebze gibi doğal ürünlerde bol miktarda bulunan oligomerik proantosiyanidinler başta olmak üzere C ve E vitaminleri ile β-karoten gibi insan sağlığına faydalı bileşikler bilimsel araştırma konusu olmuşlardır. Epidemiyolojik çalışmalarda bu tür doğal besinleri içeren diyetlerin daha uzun yaşam sağladığı ve hastalıklardan koruduğu rapor edilmiştir (HOCMAN, 1989; TEEL, 1992). Çeşitli bitkilerdeki proantosiyanidinler, elliptisin ve taksol, indol türevleri, ditiolionlar ve fitoöstrojenlerin antikanserojen veya kemoprotektif olduğu ileri sürülmüştür (HOCMAN, 1989; TEEL, 1992).

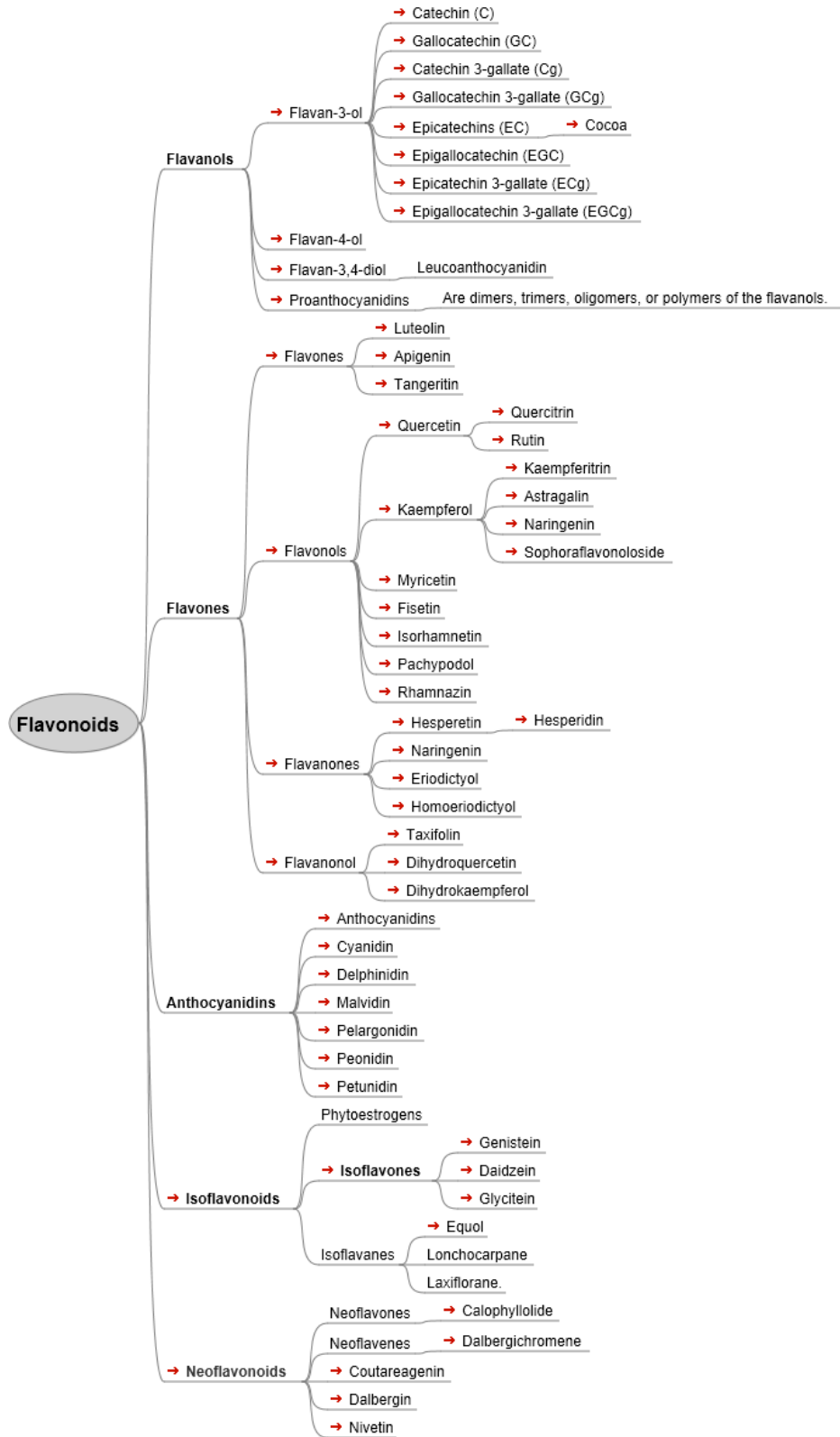
Üzüm çekirdeği ve türevleri en çok araştırma konusu olan maddedir. Bunun nedeni kimyasal içeriğinin antioksidan özellikli maddeler açısından çok zengin olmasıdır. Bunlar arasında E vitamini, flavonoidler (fenolikler veya polifenoller), linoleik asit ve oligomerik proantosiyanidinler gelmektedir (HAMMERSTONE, 2000). Dört binin üzerinde flavonoid tanımlanmıştır, bu maddeler meyve-sebzenin renginden sorumlu olduğu gibi renksiz olanlar da vardır (Şekil 1). Flavonoidler, ortasında bulunan halkanın oksidasyonuna göre temel olarak on dört sınıfa ayrılrsa da diyetle altı grup olarak sınıflanır (Şekil 2) (PETERSON, 1998).

Antosianidinler (delfinidin, sianidin, petunidin, peonidin ve malvidin gibi) kırmızı, mavi, mor renkli maddelerdir. Dut, üzüm, kiraz patlıcan gibi meyve, sebzelere rengini verir.

Flavonoller (kuersetin, kaemferol ve kuersetagetin gibi), soğan, çilek, kiraz, brokoli, elma, greyfurt, çay ve üzüm ile üzüm ürünü olan şarapta bol miktarda bulunur.

Flavanoller (flavan-3-ol'ler veya kateşinler olarak da adlandırılırlar) proantosianidinler flavanollerin dimer, trimer, oligomer ve polimerleridir. Bu grupta: kateşin, epikateşin, epikateşin gallate, and epigallokateşin-3-gallate vb yer alır. Kara üzüm, kırmızı şarap, çayda

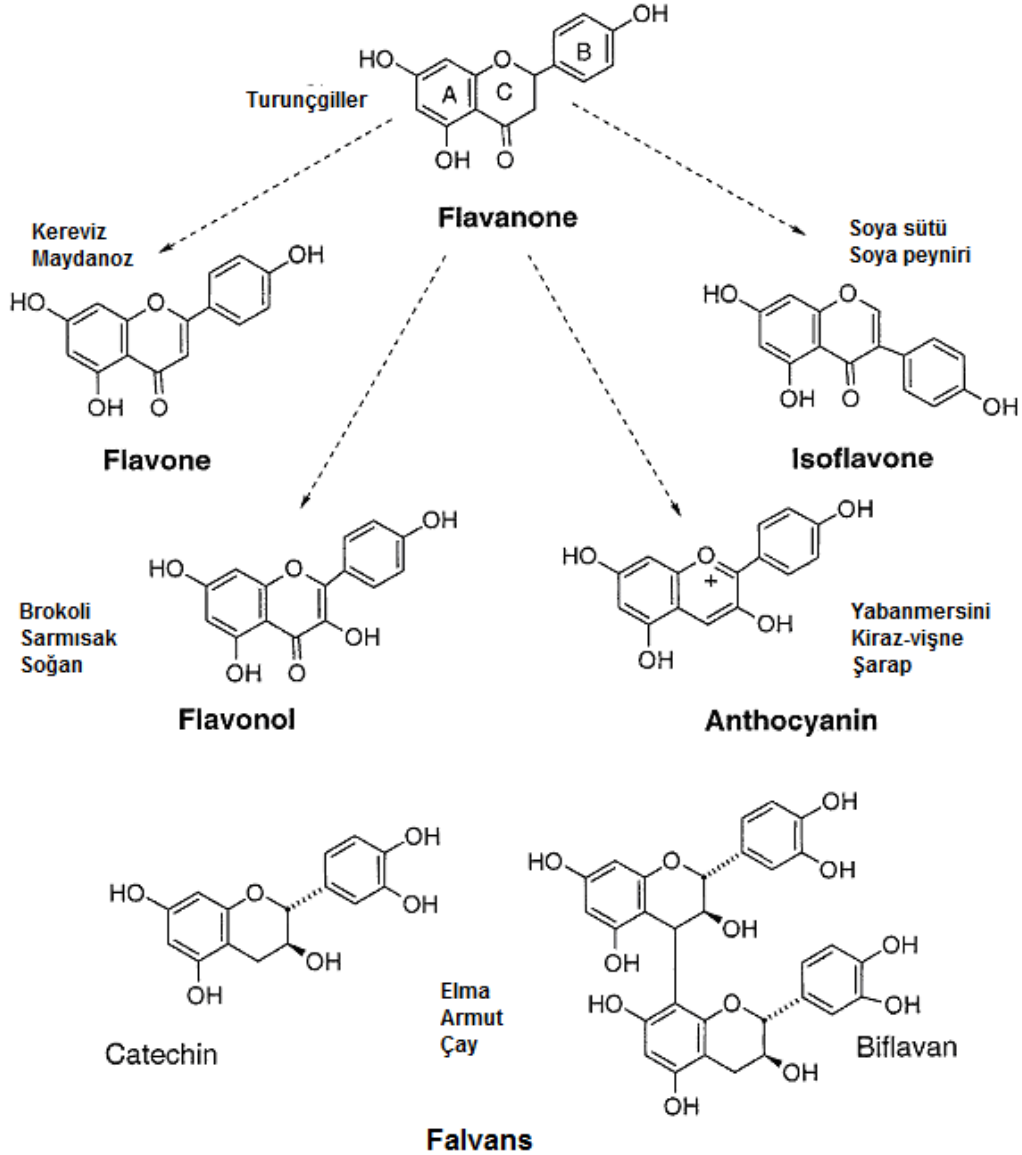
bol miktarda flavanol bu lunur (Tablo 1).



Sekil 1: Flavonoidlerin sınıflandırılması (izinli kopya © Nevit Dilmen, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Flavonoids.svg>).

Isöflavonoidler (isöflavon'lar da denir Örneğin genistein, diadzein, formononetin, biokanin A, koumestan'lar).


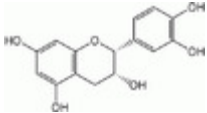


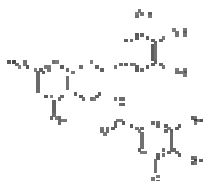
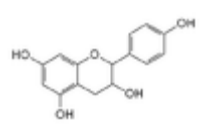

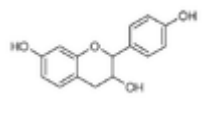
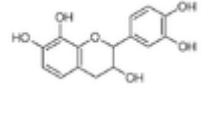
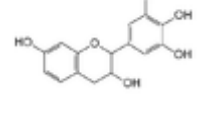
Flavonlar (örneğin: rutin, apigenin, luteolein, and krisin). Soğan, elma kabuğu, ilek, çay, limon, zeytin, kereviz, kırmızıbiberde bulunur (Şekil 2).



Şekil 2: Flavanoid yapısı ve bulunuşu. Propanoid yapısı iki birleşik halkadan oluşur. Birinci (A) halka aromatiktir, ikinci (C) halka oksijen taşıyan heterojenik bir halka olup karbon-karbon bağı ile üçüncü (B) halkaya bağanmıştır. Bu flavonoidler diğerlerinden C halkası itibarı ile farklı bir yapıya sahiptirler. Flavanlar biflavanları, kateşinleri, proantosiyanidinleri ve taninleri içerirler. Biflavan şekilde bir prosiyanidin olarak gösterilmiştir (PETERSON, 1998).

Flavanonlar (Örneğin: myricetin, hesperidin, naringin, naringenin). Limon, portakal ve bunların sularında bol miktarda bulunur.

Tablo 1: Flavanol' lere ait kimyasal yapı ve oligomerlerini gösteren tablo
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Flavan-3-ol>).

<i>Flavan-3-ol (Flavanoller)</i>			
<i>Kimyasal Yapı</i>	<i>İsim</i>	<i>Formül</i>	<i>Oligomerler</i>
	Kateşin, C, (+)-Kateşin	$C_{15}H_{14}O_6$	Proantosianidinler
	Epikateşin, EC, (-)- Epikateşin (cis)	$C_{15}H_{14}O_6$	Proantosianidinler
	Epigalokateşin, EGC	$C_{15}H_{14}O_7$	Prodelfinidinler
	Epikateşin gallat, ECG	$C_{22}H_{18}O_{10}$	
	Epigalokateşin gallat, EGCG, (-)-Epigalokateşin gallat	$C_{22}H_{18}O_{11}$	
	Epiafzeleşin	$C_{15}H_{14}O_5$	
	Fisetinidol	$C_{15}H_{14}O_5$	
	Guibourtinidol	$C_{15}H_{14}O_4$	Proguibourtinidinler
	Meskuitol	$C_{15}H_{14}O_6$	
	Robinetinidol	$C_{15}H_{14}O_6$	Prorobinetinidinler

Üzüm binlerce yıl önce ıslah edilmiş bir bitkidir. Zengin şeker içeriğinin yanı sıra yapısında bulunan antioksidan maddeler nedeni ile koruyucu, iyileştirici özellikleri olduğu eski toplumlarda da bilinmektedir. Hem meyvesinin hem de ürünlerinin kutsal olarak kabul edilmesi de bu özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak son zamanlarda keşfedilen, üzüm çekirdeğinde ve kabuğunda bulunan gallik asit, kateşin ve epikateşin gibi kimyasallar nedeniyle diyetle antioksidan olarak eklenmesi araştırma konusu olmuştur (YEMİS, 2008). Üzüm türüne göre farklılık gösterse de bu antioksidan maddeler açısından oldukça zengin bir meyvedir. *Vitis rotundifolia* varyetesi Muskadın, *Vitis vinifera* varyetesi Merlot, Chardonnay üzümünde yapılan araştırmalarda gallik asit, kateşin and epikateşin konsantrasyonu bakılmış, Muskadın çekirdeğinde 68, 7 ve 69mg/100g d.m. Chardonnay çekirdeğinde 10, 211 ve 303mg/100g d.m., Merlot çekirdeğinde 7, 74 ve 83mg/100g d.m. olarak bulunmuştur (YILMAZ, 2002).

Bu maddelerin doğal meyve olarak tüketilmesinden ortaya çıkan herhangi bir olumsuzluk bildirilmemiştir, ancak üzüm çekirdeği gibi ürünlerden elde edilen ekstraktların tüketimi ile ilgili güvenlik sınırları henüz çalışma konusudur (RAY, 2001).

SİNİR DOKUSU ve MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNİN ÖZELLİKLERİ

Canlı dokular yaşamsal olayları gerçekleştirebilmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Sinir dokusunu diğer dokulardan ayıran özellikleri vardır. Özellikle merkezi sinir sistemi bu bakımdan ayrıca ele alınmayı gerektirecek farklılıklara sahiptir. Dinlenme halinde iken toplam metabolizmanın %15'i beyin faaliyetleri tarafından oluşturulur. Sinir hücrelerinde gerçekleşen bu olaylar sırasında gerekli enerjinin büyük kısmı iyonların hücre membranından transportu için gereklidir. Aksiyon potansiyelinin sinir uzantıları boyunca iletilmesi için, iyon transportunun da bu alanlarda sürdürülmesi anlamına gelmektedir. Bu da metabolizmanın ciddi oranda artması demektir (JESPERSEN, 2012; PRESTON, 1997; FITCH, 1994).

Beyine kan akımı erişkin insanda ortalama her dakika için 0,5-0,65 ml/gr beyin dokusu olacak şekilde gerçekleşir.(FITCH, 1994). Diğer dokuların aksine sinir dokusu, özellikle beyin anaerobik metabolizma ile enerji elde etme konusunda gerekli enzimatik yapılara sahip değildir ya da çok kısıtlı bir yeteneği vardır. Çok yüksek enerji ihtiyacının olması anaerobik yollardan elde edilen verimsiz enerji ile çalışmasına engel olmaktadır. Bu nedenle oksijen ve glikojen depolanması bakımından da fakirdir. Kandaki glikoz ise insülinle bağımsız olarak beyin dokusuna girer. Beyin fonksiyonu açısından her an kan akımı ile sağlanan glikoz ve oksijene ihtiyaç olduğu için, ani akım yetersizlikleri bilincin kaybına

yol açabilir (PRESTON, 1997; FITCH, 1994; HAMNER, 2000). Bu nedenlerden dolayı beyin kan akımı sıkı bir düzenleme mekanizmasına sahiptir. Metabolizma, bu düzenlemedeki en önemli faktörlerden biridir. Üç faktör beyin kan akımını kontrolünde güçlü etkiye sahiptir.

Bunlar,

karbon dioksit konsantrasyonu,
hidrojen iyonu konsantrasyonu ve
oksijen konsantrasyonudur.

Oksijen azlığı, karbon dioksit veya hidrojen iyonu artışı beyin kan akımını arttırmaktadır. Beyin damarlarında PO_2 20 mm Hg'nin altına düşmesi beyin fonksiyonları iflasına neden olur. Arteriyel PCO_2 'de %70'lik bir artış, beyin kan akımını yaklaşık iki misli arttırmaktadır (GUYTON, 2000). Vücut sıvılarında eriyen karbondioksitin oluşturduğu karbonik asit hidrojen iyonu artışına, bu da damarlarda vazodilatasyona yol açarak kan akımını artışına yol açmaktadır (PETERSON, 2011; KARIBE, 1994). Hidrojen iyonu konsantrasyonunun artmasına neden olan durumlar beyin kan akımını artışına yol açarken, nöronal aktiviteyi büyük oranda baskılamaktadır. Bu mekanizmanın yanı sıra kan akımının yeterli olması için sistemik arteriyel kan basıncının 60-140 mm Hg arasında tutulması gerekir. Bu aralıkta seyreden basınç değişiklikleri beyin kan akımını değiştirmez. Daha yüksek basınç değerleri kanamalara, ödeme, daha düşük değerler ise beslenme bozukluğu, iskemiye yol açar (GUYTON, 2000). Ancak yenidoğan döneminde beyin arteriyel kan akımının düzenlenme mekanizmaları henüz yeterli değildir. Oksijen azlığında bu mekanizmalar yeni doğanda daha da bozulur, beslenme sadece pasif basınçla sağlanır. Bu durum kapillerlerdeki perfüzyon basıncının kontrolsüz değişimine neden olur, adaptasyon gerçekleştirilemez. Yüksek basınçlar tolere edilemediği için periventriküler ve intraventriküler kanama riski artar (BASSAN, 2005). Sempatik innervasyonun kan-beyin akımı üzerine etkisi olmadığı görüşü hâkim olsa da son çalışmalarda aşırı egzersiz veya uyandırma ile ortaya çıkan sempatik aktivasyonla artan kan basıncının, kapillerlerde yırtılmalara yol açarak beyin dokusuna zarar verebilecek etkisini azaltan, orta ve büyük arterlerde vazokonstriksiyona yol açan mekanizma gösterilmiştir (GUYTON, 2000; PETERSON, 2011; KARIBE, 1994; BASSAN, 2005; SEIFERT, 2011).

Beyinde, kapiller düzeyinde beyin bariyerini de oluşturan sıkı bir hücre ilişkisi bulunmaktadır. Diğer dokulardan farklı olarak beyin dokusunda kapillerlerin etrafı glia hücrelerinin uzantıları ile çepeçevre sarılmıştır (PATESTAS, 2006). Gri cevherin metabolik hızı beyaz cevhere göre daha fazla olduğu için bu bölgelerdeki kapiller sayısı da fazladır

(FITCH, 1994; GUYTON, 2000). Glia hücrelerinin sağladığı destek ile kapillerler beyin dokusunu yüksek basınca karşı da korumanın yanı sıra geçirgenliği de kontrol etmiş olurlar.

SİNİR HÜCRESİNİN İSKEMİ ve HIPOKSİYE DUYARLILIĞI

Beyin dokusu iskemi ve hipoksiye duyarlı dokulardandır. Metabolik beyin zedelenmelerinde hipoksik-iskemi en başta gelen nedenlerdendir. Doğum sırasında meydana gelen olumsuzluklar yeni doğanın hipoksik-iskemisine yol açar. Henüz gelişimini tamamlamamış beyin dokusu bu aşamada maruz kaldığı hipoksik-iskemi nedeni ile geri dönüşümü zor olan kayıplara uğrar. Bu süreç HİE olarak adlandırılır. Buradaki beyin hasarı, hipoksik-iskeminin başlangıcından reperfüzyon sonrası iyileşme sürecine kadar devam eden bir dizi olayı içerir (DANI, 2004; VANNUCCI, 1997).

Beyindeki hasar, sinir hücresinin nekrozu veya infarkt olarak meydana gelmektedir. Dokunun tümünde (sinir hücresi, destek hücreler ve damar yapıları dâhil) hasar oluşmaktadır. Olayın merkezinden çevresine doğru yayılan kademeli bir etkilenme söz konusudur (HAKIM, 1998). Merkezdeki infarkt alanında şiddetli hasar olurken, çevresel yapılar hasarın derecesine göre nekroz veya apopitoz ile kaybedilecek hücrelerin yanı sıra, iyileşebilecek hücreleri içerir (PERLMAN, 2006; MEMEZAWA, 1992; VEXLER, 2001).

İskemi ve hipoksinin beyin dokusundaki etkisi ile hücre içindeki normal biyokimyasal yollar bozulur. Oksijen azlığı nedeni ile enerji elde edilmesinde anaerobik mekanizmalar devreye girer. Normalde tolere edilebilecek düzeylerin üstüne çıkmayan maddelerin birikimine neden olur (nikotinamid-adenin-dinükleotid, flavin-adenin-dinükleotid, laktik asit ve H^+). Anaerobik yoldan elde edilen enerji normal metabolizmanın devam etmesine yetmeyeceği için iyon pompaları bozulur, bu durum intrasellüler iyon ve su birikimine, yani sitotoksik ödeme yol açar. Ayrıca eksitator aminoasitlerin aksonal uçlardan salınarak membran reseptörlerini uyarması ile hücre içine fazla Na^+ , Ca^{++} iyonu girişine neden olur. Bu süreç sırasında yapıyı tetiklenen diğer maddeler prostaglandin, ksantin ve ürik asittir. Normal metabolizmanın bozulması ile sitozolde biriken serbest yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile perokside olması ortam dengesini daha da bozar. Enerji yetmezliğinden kaynaklanan iyon transportundaki bozukluk kalsiyum iyonlarının hücre içinde birikimine neden olur. Bu olaya hücre içi organellerden çıkan kalsiyum iyonları da eklenir. Kalsiyumun aktive ettiği nitrik oksit çevre hücrelere diffüze olarak toksik etki gösterir. Sonuçta hücredeki enerji açığı, asidoz, glutamat nitrik oksit, serbest radikal oluşumu, Ca^{++} birikimi ve lipid peroksidasyonunun birlikte etkileri önce hasara, sonunda da hücrenin ölümüne neden olur

(VANNUCCI, 1997; HAKIM, 1998; PERLMAN, 2006; MEMEZAWA, 1992; VEXLER, 2001).

Tedaviye duyarlılık, hasarın oluşma zamanı ile yakından ilgilidir. Yeni doğanda bu süre erişkine göre daha kısadır. Yeni doğanda saatler, erişkinde ise günler arasında değişebilen bu süreye terapötik pencere denir (PERLMAN, 2006; 45, LIN, 2011; PARK, 2006; ISLAM, 1995).

Yeni doğanda hücre yıkımı saatler içinde gerçekleştiği için tedaviye bir iki saat içinde başlanması önerilir (VANNUCCI, 1997).

HİPOKSi-İSKEMİNİN ÖZELLİKLERİ VE BEYİN DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ

Hipoksi kan akımının azalmasının yanı sıra, pulmoner veya plasental gaz değişiminin bozulması sonucunda da görülür. Hipoksemi veya hiperkapni, oksijenin dokularda kısmen azalması veya tamamen olmaması halidir, doku kan akımında azalma olarak tanımlanmaktadır (VANNUCCI, 2000). İskemi ile birlikte hipoksi, dokuda karbondioksit fazlalığı (hiperkapni-hiperkarbi) ve asidoza yol açar (AMATO, 2000). Beyin dokusunu ilgilendiren hipoksi durumunda oteregülasyon mekanizmaları beyin arteriel kan akımını artırır, ancak hipoksinin uzaması bu refleksi bozar, kan akımını azalır (AMATO, 2000; VOPE, 2001).

İnsanda görülen HİE'nin araştırılmasında laboratuvar ortamında deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Kan akımının azalmasını (tıkanma) taklit için bir tarafta a.carotis communis bağlanır. Hipoksinin gerçekleşmesi için denek bir süre hipoksik ortamda tutulur (Vannucci, 1990). Bu yöntemin insandaki HİE hasarına benzer şekilde beyin hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Deneysel modellerde iskemi tam ya da odağa özel (global, fokal) olarak da gerçekleştirilebilir. İskemi yanında hipoksik ortamın yaratılması ise hipoksi/iskemi olarak adlandırılmaktadır. Erişkindeki beyin metabolizması ile henüz gelişmekte olan beyinin metabolizması birbirinden farklıdır. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalardaki yöntemler farklılık gösterir (VANNUCCI, 2004; HOCHACHKA, 1996; SCHMIDT-KASTNER, 1990). Hastalık veya bu deneyler sonucunda kan akımının azalmasının derecesine bağlı olarak beyin dokusunda sırası ile

elektron transport sisteminin inhibe olması,

ATP azalması,

serbest radikal oluşumu,

söz konusudur. Son olay özellikle reperfüzyon ile en yüksek seviyede gerçekleşir. Bu da reperfüzyon hasarına yol açar.

Hipoksi-iskemi sonucunda hücre ölü mü apopitozis ve otofagositoz ve nekroz olmak üzere üç şekilde gelişir (MAJNO, 1995; BURSCH, 1996; CLARKE, 1990). İlk iki tip hücre kaybı daha çok gelişim sırasında görülen fizyolojik süreçler olmasına rağmen, ağır hücre zedelenmesi sonucu ortaya çıkan hücre ölümünde otofagositoz daha çok görülür (BURSCH, 1996; CLARKE, 1990; NIXON, 1993). Nekroz ise yalnızca dış etkilerle oluşur. İskemik olaylarda birden fazla yolla hücrelerin ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir (TRUMP, 1980). Bu süreç:

oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu,
hücre zedelenmesi süreci aktivasyonu,
pH'da azalma,
ATP'de azalma ve buna bağlı olarak serbest radikal yapımının başlaması,
intraselüler Na^+ artışı,
ATP açığı sonucu Na^+ - K^+ pompasının yetmezliği ve membran depolarizasyonu şeklinde seyretmektedir.

Yukardaki olaylara ilave olarak iyon dengesizliği (özellikle hücre içi kalsiyum artışı) ve hücre içi kimyasal değişikliklerin ortaya çıkması ile hücre ölüm mekanizmaları tetiklenmektedir (Şekil 3) (LEE, 2000).

Her bir sonraki basamağın devreye girmesi geri dönüşü zorlaştırdığı gibi ortaya çıkacak sonucun ağırlığını da artırmaktadır. Parçalanmaya ve durumun geri dönüşümsüz hal almasına neden olan maddeler (proteazlar, fosfolipazlar ve serbest radikaller) nekrotik süreçte önemlidir. Kaspaz ve diğer faktörlerle ilgili bilgiler olmasına rağmen iskeminin apoptozisi nasıl tetiklediği tam olarak açıklanamamaktadır (LIPTON, 1999).

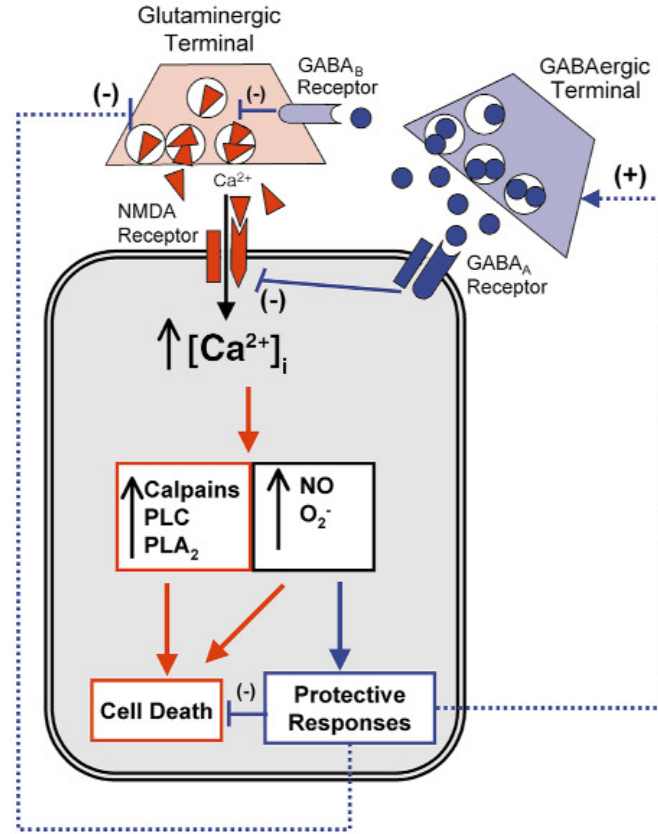
Beyin kan akımı iskemiye duyarlıdır. İskeminin başlangıcında 15 dakikadan az olmayan bir süre ile kan akımı yaklaşık üç kat artar (CRUMRINE, 1991; PULSINELLI, 1982). Takip eden gün içinde ise ciddi kan akımı azalması oluşarak normalin yarısına kadar iner (KAGSTROM, 1983; STEN, 1978). İskemi sonrası dokularda metabolizma yavaşladığından glikoz kullanımı da azalır (KAGSTROM, 1983; JR EDMONDS, 1985; MICHENFELDER, 1990; KOZUKA, 1989). Kan akımının ve glikoz kullanımının azalması lokal iskemilerde de görülen bir durumdur (CHEN, 1995; MURPHY, 1990; BELAYEV, 1997; ZHAO, 1997).

İskeminin etkilediği mekanizmalardan bir diğeri de kan-beyin bariyeridir (YANG, 1994). İskeminin ardından altıncı saatte solut maddelerin bariyerden geçişi katlanarak artmaktadır, ancak bir gün sonra normale dönmektedir (PRESTON, 1997). Beyin dokusunda

protein tutulumu da iskemi sonrasında görülen olaylardandır. Reperfüzyon sırasında endotel hücrelerinin etkilenmesi ve serbest radikal artışı damar hasarını ileri boyuta taşır, bu da dokudaki ödemin gelişmesini hızlandıran ortamı hazırlar (YANG, 1994; OLESEN, 1987).

Vücut sıcaklığının düşürülmesi ise hücre ölümünü azaltmaktadır (BAENA, 1997; BAKER, 1992). Bu nedenle uygulanacak deneysel hayvan modellerinde sıcaklığın sabit tutulması önemlidir.

Beyin dokusunun her alanı iskemi ve hipoksiye karşı aynı duyarlılıkta değildir. En duyarlı olan bölgeler limbik sisteme ait kortikal alanlardır. Ayrıca serebellum, striatum, serebral korteksin derin tabakaları da iskemiyeye duyarlı hücrelerden oluşmaktadır (NIXON, 1993).



Şekil 3: Lee ve ark. makalesinden alınan bu şemada kırmızı oklar ile gösterilen yolda beyin dokusunda iskemi ile uyarılmış hücre ölümü şematize edilmektedir. Aynı anda mavi oklarla iskemiye karşı gelişen tolerans ve koruyucu mekanizma temsil edilmiştir. İskemi sırasında glutamatın sinaptik aralığa boşaltılması ve NMDA reseptörlerinin aktive edilmesi kalsiyum girişini artırmaktadır. Kalsiyum ise sonunda hücre ölümü ile sonuçlanan birçok yolağı aktive eder (oksijen ve NO radikal artışı, katabolik enzimatik aktivasyon gibi). Tam ölümle sonuçlanmayan zedelenmeler aynı zamanda çoğu NMDA reseptörleri ve kalsiyum kontrollü yollar üzerinden olan hücre koruyucu sistemleri de harekete geçirir. Koruyucu sistem ağırlıklı olarak sinir sonlanmalarında GABA salınımını artırarak glutamat salınımını azaltıyor olabilir. Büyük olasılıkla GABA presinaptik olarak GABA-B reseptörleri ve G proteinlerini etkileyerek glutamat salınımını azaltırken, postsinaptik membranda GABA-A reseptörleri etkileyerek kalsiyum girişi ve membran depolarizasyonunu kontrol etmektedir (LEE, 2000).

Mitokondri hasarı da hücre ölümünde önemli ölçüde role sahiptir (KLUCK, 1997; KROEMER, 1998; YANG, 1997). İskemi sonucu mitokondrideki ATP düzeyinin azalması, serbest radikal oluşumu, Ca^{++} tamponlama etkisinin ortadan kalkması zedelenmeyi üst düzeyde taşımaktadır. Bu durum mitokondrial enzimlerin çalışmasını ve mitokondri membranındaki geçirgenliği etkilemektedir. Artan geçirgenlik mitokondri içinde iyon ve moleküllerin birikimine neden olmaktadır. Membran transport proteinlerinin açılması apoptozu başlatan proteinlerden birinin serbestleşmesine, bu da apoptozun başlamasına neden olmaktadır (ESKES, 1998; REED, 1997).

Enerji metabolizması ve iyon konsantrasyonunun bozulmasının etkilediği diğer bir süreç de protein sentezidir. İskemi sonrası beyinde, protein sentezinde derin bir inhibisyon gözlenir. Yıkım sonucu oluşan protein ihtiyacı karşılanamaz. Bu protein sentezi inhibisyonu uzun sürecek olursa yıkımın tamiri mümkün olmayacağı için hücre kaybedilir. Deneysel iskemi modellerinde deneyin özelliğine göre bu inhibisyonun süresi bir güne kadar uzayabilir. (COOPER, 1977; WIDMANN, 1993). Geri kazanılacak hücrelerde protein sentezinin bir iki gün içinde tamamen normale döndüğü gösterilmiştir. Ancak kaybedilen hücrelerde sentez normale dönmemektedir (WIDMANN, 1993; DIENEL, 1980; DIENEL, 1986). Enerji açığı hücre iskeletinin de çökmesine neden olur. Sinir hücresine özgü transportu sağlayan mikrotubuler yapılar da bundan etkilenir ve dağılır. Bu durum da ödeme yol açar (KALIMO, 1982; KALIMO, 1981).

Tüm bunların yanı sıra yapısal zedelenmeyi hızlandıran bazı faktörler söz konusudur. Bunlar:

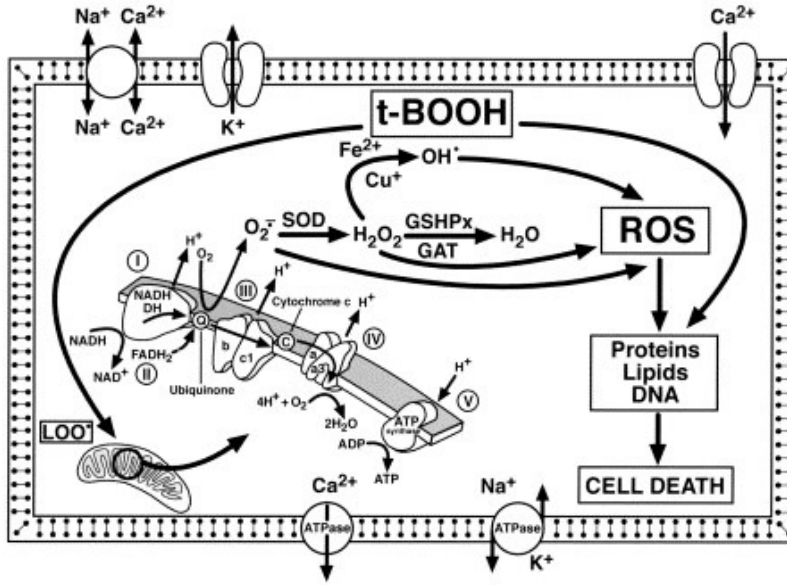
- Serbest Radikaller
- Ca^{++} Bağımlı Proteaz
- Prostaglandinler ve Lökotrienler
- Nitrik Oksit Üretimi

Aralarında nitrik oksit'in de (NO) yer aldığı serbest radikaller çok küçük konsantrasyonlarda oluşan ve stabil bir yapıya sahip olmayan yüksek enerjili bir manyetik alan oluşturan moleküllerdir. Oluştukları bölgeden çok uzaklaşamaz ve birbirleriyle birleşerek stabil bir molekül oluşturabilir veya başka bir moleküle birleşerek yeni serbest radikal oluşturarak hücre zarı, DNA gibi yapılarda hücre hasarı ile sonuçlanan zincir reaksiyonların başlamasına neden olabilirler (VANNUCI, 1990; VANNUCI, 1997; MİLDE, 1994).

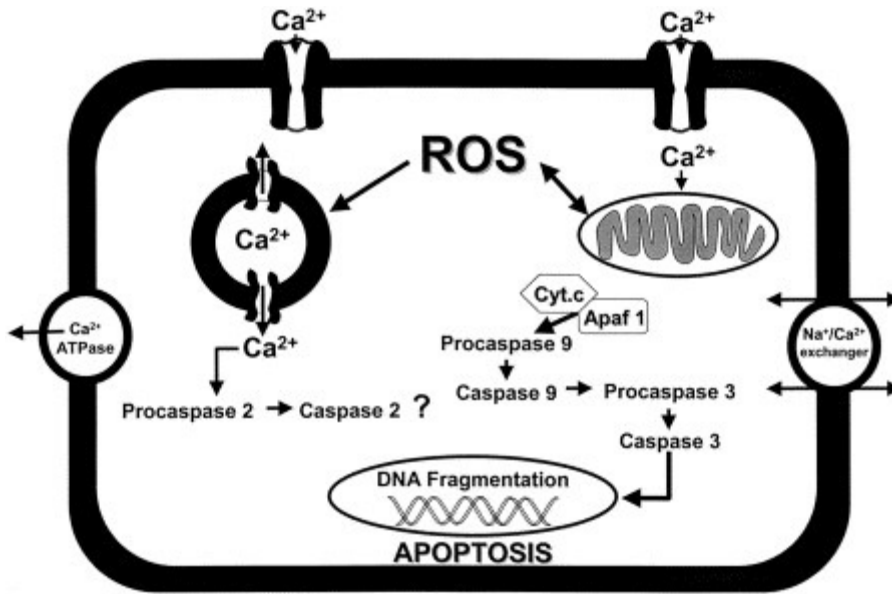
Hücredeki oksijen kaynaklı serbest radikallerin büyük bölümü serbestleşmeden sitokrom oksidaz tarafından redükte edilir. Geriye kalan küçük bir bölüm süperoksit anyon radikalini oluşturan sitoplazma ve mitokondrideki oksidasyon-redüksiyon olaylarına katılır (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). Yani normal şartlar altında da serbest radikaller oluşmaktadır (VANNUCI, 1997).

Hücreler, serbest oksijen radikallerinin tahrip edici etkilerine karşı kendilerini korumak için enzimatik ve enzimatik olmayan yollara sahiptir. Enzimler süperoksit dismutaz, endoperoksidaz ve katalazdır. Bu enzimler hidrojen peroksidi suya veya stabil oksijene dönüştürürler. Ek koruma mekanizmaları kolesterol, alfa-tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C Vitamini) ve glutatyon gibi tiyol içeren bileşiklerdir (VANNUCI, 1997; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). Serbest oksijen radikalleri hipoksik-iskemi sırasında ve sonrasında çeşitli yollarla oluşmaktadır. Bu yollardan birisi sitokrom oksidazın oksijenle tam olarak doygunluğa ulaşmadığı durumda mitokondride serbest radikal oluşumudur. Tam olarak elimine edilemeyen bu moleküller serbest dolaşıma geçer.

Hipokside membran reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun yol açtığı intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunda artış, sitotoksitede son basamaktır (Şekil 4, Şekil 5) (ANNUNZIATO, 2003). Bu olay ayrıca fosfolipaz A aktivasyonu siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları üzerinden serbest oksijen radikallerinin oluşumunu da artırarak olayı hızlandırır. Serbest oksijen radikalleri zincirleme reaksiyon sonunda membran lipidlerinin peroksidasyonu ile membranları parçalayarak hücrelere zarar vermektedir (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). Eksojen faktörlerin yanı sıra endojen korunma mekanizmalarının yetersiz olduğu durumlarda serbest radikaller ve süperoksid, hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türleri doku hasarı yaratırlar. Henüz gelişimini tamamlamamış prematüre bebeklerde süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzim eksiklikliği nedeniyle hipoksi gibi dispozan faktörler daha çok zarara yol açarlar.



Şekil 4: Deneysel olarak t-buty l hydropoxide (*tBOOH*) ile indüklenmiş hücre ölümünün şematik açıklaması (ANNUNZIATO, 2003).



Şekil 5: Reactive oxygen species (ROS) ile uyarılmış apoptozun şematize edilmiş süreci (ANNUNZIATO, 2003).

Ca⁺⁺ Bağımlı Proteazlar hücre içine aşırı miktarlarda giren kalsiyum tarafından aktive edilerek membranların parçalanmasında rol oynarlar. Başlangıçta proteaz aktivasyonu reseptör ve transport sistemlerinin çökmesine neden olur. (MILDE, 1994). Kalsiyumun hücre içinde artışı aynı zamanda membran fosfolipidlerinin hidrolizi sonucu serbest yağ asitlerinin

ortaya çıkmasını sağlar, bunlarda hasarda etkili olur. (MILDE, 1994; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998).

Prostaglandinler ve lökotrienler dokularda yaygın olarak bulunurlar. Hücre içinde yer alan bu otakoidler bazı durumlarda hücreler arası sıvıya ve kana karışırlar. Vasküler tonus üzerinde etkili olan bu maddelerin öncü molekülleri, hipoksik iskemide oluşan enerji açığı ve ardından gerçekleşen hücre içi kalsiyum artışı ile başlayan serbest yağ asitlerindeki artış ile ortaya çıkarlar. En önemlileri arasıdonik asit ve lyso-PAF'dır (SIESJO, 1992). Bu maddeler prostoglandin, lökotrien ve trombosit aktive edici faktörün (PAF) öncü maddeleridir (MILDE, 1994). Prostaglandin ve lökotrienler, serbest radikal oluşumu ve inflamasyonu artırarak beyin zedelenmesinde rol almaktadır (SIESJO, 1992).

Dokuda yoğunluğu değişen kalsiyum, çinko gibi elementlerin yanı sıra eksitatör aminoasitler ve düşük pH beyin dokusunda fonksiyonel değişikliklere neden olurlar. İki değerli kalsiyum, organizmadaki biyokimyasal reaksiyonda kofaktör olarak görev yapması nedeniyle metabolizma açısından yaşamsal dengelerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum düzeyinin belli bir aralıkta kalması için enerji gerektiren düzenleyici mekanizmalar vardır. Kalsiyum yoğunluğunda meydana gelecek değişiklikler, özellikle hücre içinde artışı hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (VANNUCI, 1997).

Hipoksik-iskemi sırasında oluşan enerji açığı, ATP azlığı nedeniyle kalsiyum düzenleyici pompaların çalışmasında yetersizlik ortaya çıkar ve hücre içinde kalsiyum birikmeye başlar (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). Hipoksi ile birlikte olan kan akımındaki yetersizlik glikoz ve oksijen açığına, bu durum da enerji açığına yol açarak sinir hücrelerinin depolarizasyonuna neden olur. Dolayısıyla depolarize sinir uçlarından sinaptik aralığa glutamat salınımı gerçekleşerek AMPA, kainate ve NMDA gibi reseptörleri uyandır. Bu reseptörlerden hücre içine kalsiyum girişi başlatılır (Şekil 3-5) (LEE, 1999).

Asıl mekanizması bilinmemekle birlikte hipoksik ortamdaki nöronlarda çinkonun da biriktiği saptanmıştır (FREDERICKSON, 1989). Çinkonun nöron metabolizmasında nasıl bir rol oynadığı açıklanamamıştır, ancak çinko bağımlı aktif proteazlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (TSUDA, 1997; CHOI, 1998; WEBER, 1996).

Glutamik asit başta olmak üzere beyindeki eksitatör aminoasitler hipoksi, iskemi ile başlatılan patolojik süreçlerde nöron hasarında rol oynarlar. Buradaki temel mekanizma yine glutamat salınımının artışı ve hücre içine kalsiyum girişinin başlatılması ile gerçekleşmektedir (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). Normal uyarı sürecinde sinaptik aralığa salınan glutamatın presinaptik uca geri alımı nedeni ile sinaptik aralıkta konsantrasyonu dengelidir

(MILDE, 1994). Geri alım mekanizması da ATP bağımlı çalıştığı için hipoksi iskemisi sırasında geri alım mekanizması bozulur ve sinaptik glutamat konsantrasyonu artar, reseptör stimülasyonu uzar (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998).

Glutamat'ın da uyardığı üç reseptör grubundan NMDA reseptörleri telensefalona ait yapılardan beyin korteksinde, hipokampusun CA1 tabakasında ve bazal nükleuslarda bulunur. Diensefalonda ise talamik nükleuslarda saptanmıştır. Ayrıca serebellum korteksinde de purkinje ve granüler hücre tabakalarında yer alır. AMPA reseptörleri de aynı bölgelerin değişik tabakalarında yerleşmiştir. Hipokampusun stratum lucidum tabakasında kainat reseptörleri gösterilmiştir. Aspartat bu üç reseptör grubundan sadece NMDA reseptörleri ile etkileşmektedir. Bu reseptörlerin membran katyon kanalları ile bağlantılı olması nedeni ile kainat ve AMPA reseptörlerinin uyarısı Na^+ geçişine yol açarken, NMDA reseptörlerinin uyarısı Na^+ ve Ca^{++} girişine neden olur (MILDE, 1994). Aşırı uyarı sonucu özellikle NMDA reseptör aracılığıyla oluşan nörotoksikite fetüs beyininde daha şiddetlidir (KOZUKA, 1989). Hipokampus CA1 bölgesinde yoğun olarak bulunan NMDA reseptörü hafıza ve öğrenme açısından önemli bir yapı olmasının yanı sıra hipoksik iskemisi sırasında da duyarlılığın yüksek olduğu bir alana karşılık gelir (DELIVORIA-PAPADOPOULOS, 1998). İskeminin akut döneminde oluşan ödeme bağlı olarak yukarıda açıklanan mekanizmalarla hücre içi aşırı iyon birikmesi sonucu 24-72 saat içinde ani hücre ölümleri gerçekleşmektedir. (MILDE, 1994; SIESJO, 1992).

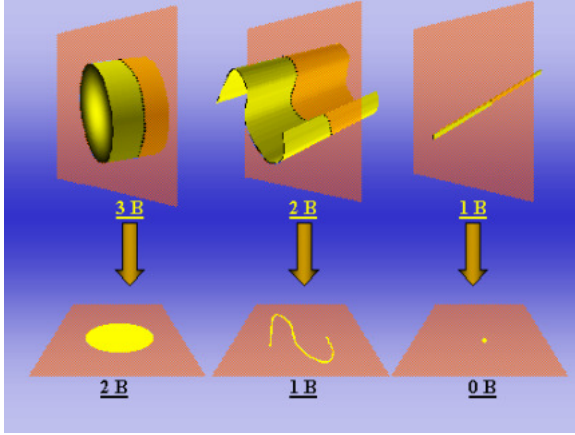
Hipoksi ve iskeminin yarattığı hücre içi-hücre dışı pH azalması sonucu enerji metabolizması bozulur. Oksijenli solunumda enerji verimliliğinin yüksek olmasının yanında ortam pH sını düşürecek metabolitlerin ortaya çıkmaması da söz konusudur. Oksijensiz ortamda gerçekleşen reaksiyonlarda glikozun yıkılması ortamda laktik asit ve H^+ iyonları birikimine neden olarak ortam pH sını düşürür. Enerji açığı nedeni ile iyon pompalarının iyi çalışmaması, iyon konsantrasyonunun hücre içinde artışı ile organellerdeki metabolizma olaylarının daha da bozulmasına yol açar. Olayın derinleştiği durumda H^+ iyonları ortamı kararsızlaştırarak Ca^{++} iyonlarını bağlı olduğu bölgelerden ayırarak intrasellüler iyon artışını zorlar. Parçalanmış glikozun yol açtığı bu asidoz, iskemisi hipoksi sırasındaki glikoz konsantrasyonunun fazlalığı ile orantılı olarak artar (SIESJO, 1992).

STEREOLOJİK YÖNTEMLER VE OPTİK PARÇALAMA

Uzaydaki üç boyutu ifade eden “stereo” kelimesi yaygın olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak stereoloji derinliği görülemeyen yapıların inceleyen bilim dallarının

ortaya çıkardığı bir yöntem bilimidir. Maden rezervlerinin saptanmasından, birbiri içindeki iki biyolojik yapının hacminin hesaplanmasına kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. Terminoloji olarak 1960' larda bilimsel alanda telaffuz edilmesine rağmen temelleri 1630' larda Galileo' nun öğrencisi Bonaventura Cavalieri' ye kadar dayanır. Cavalieri' nin ortaya attığı bir teknik, hâlâ cisimlerin hacimlerinin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Stereolojik yöntemler, üç boyutlu olarak değerlendirilmesi imkânsız olan biyolojik yapılardan alınan iki boyutlu kesitlerden yola çıkarak, üçüncü boyut hakkında bilgi edinmeyi sağlayan istatistik ve geometrik yöntemler yumağıdır. Değerlendirilmek istenen yapının boyutu ile uyumlu bir sonda sistemi kullanır. Burada mantık iki boyutlu kesitlerde ortaya çıkan boyut kaybı üzerine kuruludur. Eğer bir nokta ile ilgilenebilir ise mutlaka üç boyutlu bir sonda kullanılmalıdır, çünkü noktanın uzayda boyutu yoktur. Eğer bir çizgi ile ilgilenebilir ise iki boyutlu bir sonda kullanılmalıdır. Bir alan ile ilgilenebilir ise bir boyutlu, hacim için ise nokta sonda kullanılmalıdır (Şekil 6).



Şekil 6: İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması (<http://stereoloji.blogspot.com/p/stereoloji-nedir.html>).

Stereo takma adı ile 1984 yılında yayınlanan bir makalede disektör yönteminin tanımlanması mikroskobik yapılarda uygulanan stereolojik yöntemlere yeni bir boyut kazandırmıştır (STEREO, 1984). Stereolojik yöntemlerin en önemli özellikleri etkin, tarafsız ve kesin olmalarıdır. Etkin, tarafsız, gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen, güvenilir sınırları içerisinde istatistiksel olarak gerçek değere en yakın sonuç veren yöntemler olmaları nedeni ile tercih edilirler.

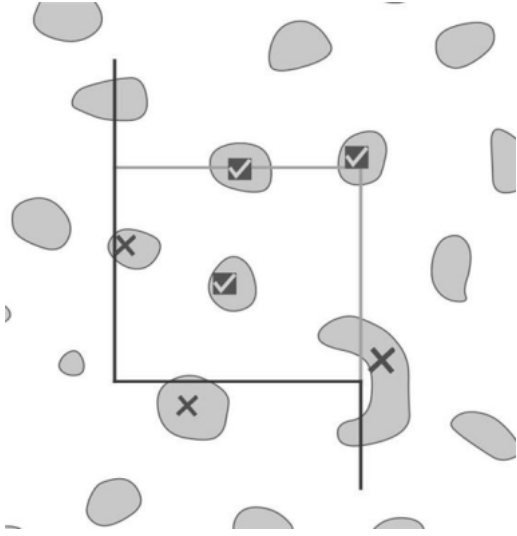
Stereolojik kurallara uygun olarak yapılacak çalışmaların önceden belirlenmiş stratejiye uygun olarak işlemesi gerekir. Bunun için denek seçiminden itibaren doku

örneklerinin seçimi ve hücre sayımı sırasındaki mikroskop alanı seçimi, doku kalınlığının seçimi gibi her işlemde önceden belirlenmiş örnekleme stratejisi uygulanır. Bu stratejinin temel amacı hata oranını en aza indirmektir. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda istatistiksel yöntemlerin önerdiği bir evreni en iyi temsil edecek örneklem sayısı ve dağılımının seçiminde kullanılan yöntemler temel alınmıştır.

Burada amaç dokunun her alanına eşit oranda örnekleme olasılığı tanınmasıdır. Bunun için rasgele seçme olasılığı tanıyan parçalama yöntemleri kullanılır. Bunlar fiziksel parçalama, düzeltilmiş parçalama (smooth fractionator) (GUNDERSEN, 2002), ile sağlanan parçalardan seçim yapılırken sistematik rastgele yöntem uygulanırken doku içeriğinin yöneliminde isector, orientator (MATTFELDT, 1990) gibi yöntemler kullanılarak rastgelelik sağlanır. Rastgele örnekleme tarafsızlığına ek olarak tüm alanların taranması olasılığını sağlamak için sistematik bir örnekleme stratejisi seçilir. Bunun için dokunun içinden yeterli sayıda örnek alınacak şekilde bir aralık belirlenir (GUNDERSEN, 1988). Elde edilecek örnek sayısı sayılacak hücre yoğunluğu ile orantılı olmalıdır. Çünkü tüm örneklerden sayılacak toplam hücrenin 150-250 arasında olması yeterli kabul edilir. Burada hazırlanmış nomogramlardan yararlanılarak en uygun hata oranı ile hesaplamaların yapılması planlanır (GUNDERSEN, 1987).

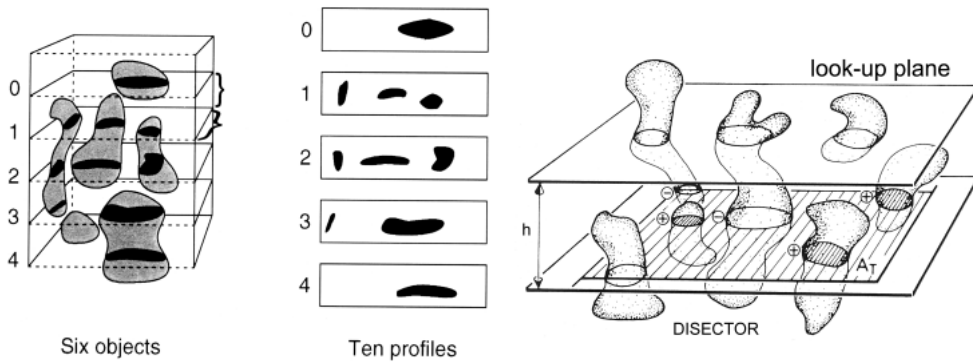
Sistematik rastgele örnekleme stratejisi, belli bir örnekleme aralığı saptanarak ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlanıp yapının tamamının örneklenmesidir. Bu örnekleme özelliği sistematik olması yanı sıra dokunun her alanına eşit örnekleme şansı tanınmasıdır. Stereolojik bir çalışma yapılırken hayvan seçiminden, hücre seçimine kadar örnekleme gerektiren her seviyede sistematik rastgele örnekleme yapılmalıdır.

Sayım ya da ölçüm yapılacak iki boyutlu bir görüntü kullanılacak ise stereolojik yöntemlerin gereği olan bir diğer araç *tarafsız sayım çerçevesi*dir (Şekil 7). Doku kesitleri mikroskop ile ekrana aktarılmış veya fotoğraf haline dönüştürülmüş iken görüntü alanına giren yapıların değerlendirilmesinde tarafsızlık sağlayacak bir yöntemdir (STEREO, 1984). Bu çerçeve sayesinde objelerin olduğundan daha fazla sayılmasının önüne geçilmiştir. Çerçevenin normal bir çerçeveden farkı, sol kenarının yukarı, sağ kenarının aşağı doğru uzantılara sahip olmasıdır. Sayım sırasında sol ve alt kenarlar ile uzantılara değen yapılar dikkate alınmazlar (yasak kenarlar). Yalnızca çerçevenin tamamen içerisinde olan veya sağ ve üst kenarlara (serbest kenarlar) değen yapılar sayıma dâhil edilir. Sayım yapılacak görüntü üzerine bu çerçeve herhangi bir teknik ile konulabilir.



Şekil 7: Tarafsız sayım çerçevesi (Unbiased counting frame); koyu renkli çizgi yasak kenarı, açık renkli çizgi serbest kenarı ifade eder. Çentik olan partiküller sayıma dahil edilirken çarpı konulanlar dahil edilmez (<http://www.stereology.info/criteria-for-counting-cells/>).

Disektör ve optik disektör kavramı iki boyutlu kesitlerin incelenmesinde oluşan boyut kaybını ortadan kaldırmak amacıyla uygulanan tekniğe ait terimlerdir. Biyolojik yapıların incelenmesi sırasında ortaya çıkan korpuskül problemi S.D. Wicksell tarafından ortaya çıkartılmıştır (WICKSELL, 1925). Kesitleri alınan biyolojik yapıların içinde yerleşmiş cisimcikler sayılırken gerçek sayıdan daha fazla kesit görüntüsü ortaya çıktığı, sayım sonucunun gerçekten daha fazla olduğu gösterilmiştir. Buna çözüm olacak disektör prensibi ilk defa 1984 yılında Sterio DC tarafından, optik disektör ise 1986'da Gundersen tarafından tanımlanmıştır (STEREO, 1984; GUNDERSEN, 1986) (Şekil 8).



Şekil 8: Biyolojik kesitlerde ortaya çıkan fazla sayıdaki kesit görüntüsü, altı objeden on kesit görüntüsü oluşması (sol ve ortada). Disektör ile fazla kesit görüntüsünün yol açacağı aşırı sayımın önüne geçilmesi (sağda). Disektörle alınan ardışık iki kesitten birinde görünüp diğerinde görünmeyen objeler sayıma dâhil edilir (STEREO, 1984; http://www.disector.com/The-History-Of-Modern-Stereology_c_41.html).

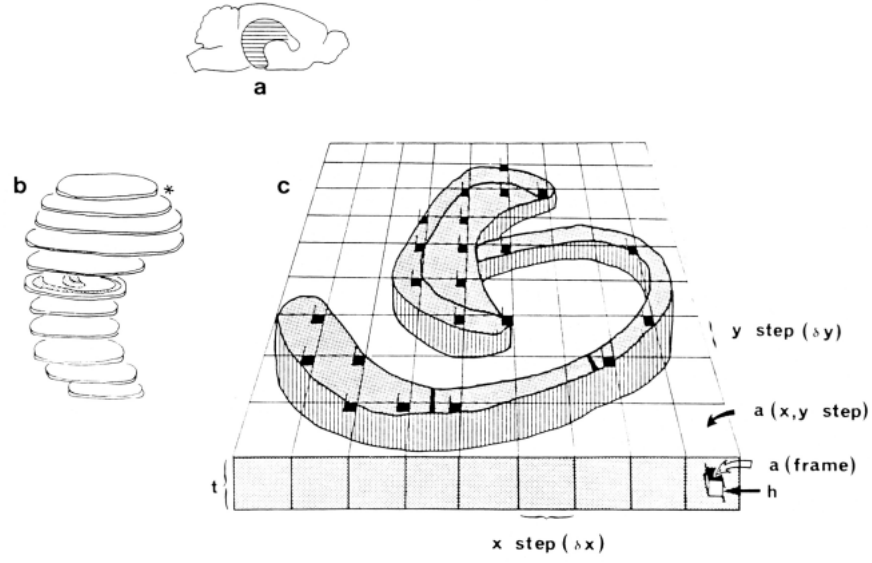
Fiziksel olarak alınan kesit-görüntü çiftleri üzerinden yapılan sayımların zahmetli olması optik disektörün doğmasına yol açmıştır (GUNDERSEN, 1986). Burada kalın kesitlerin içinde optik olarak elde edilen disektörler kullanılmaktadır. Doku içinde ilerlerken objenin ilk ya da son görüldüğü nokta sayılmak kaydı ile aşırı sayımın önüne geçilmektedir. Yöntemin temeli şeffaf, kalın histolojik kesitlerden sanal olarak optik kesitler elde etmeye dayanır. Tek kesitte çalışma ve daha az kesit alma nedeniyle daha hızlı uygulanan bu yöntem, hızlı sayım yapmanın yanı sıra partikül hacmini ölçme gibi işlemlere de olanak sağlar.

Optik disektör yönteminde en büyük sıkıntı kalın kesit alınmasıdır. Burada alınacak kesitin kalınlığı sayımı yapılacak partikülden daha büyük olmak zorundadır. En az 20 µm olarak alınacak bu kesitlerde dokunun lam üzerine yapışması ve boyanması ile ilgili sorunlar ortaya çıkmaktadır. Görüntünün yatay düzlemdeki keskinliği açısından sayısal açıklığı büyük objektifler (1,35-1,40) kullanılması gerekmektedir. Bu sayede derinliği en az olan optik kesitler elde edileceği için kesitin üst yüzü ile alt yüzü arasında ilerlerken ardışık optik kesitler alınmış olur. Bu görüntü üzerine uygulanacak bir tarafsız sayım çerçevesi içinde disektör sayım kuralına göre hücre-partikül sayımı tamamlanır. Böylece üç boyutlu bir sonda ile doku içinden geçilmiş olur.

Hacim hesaplaması gerektiren durumlarda mikroskoba eklenecek mikrokator gibi, mühendislik alanında kullanılan mikrometre düzeyinde uzunluk ölçebilen aletlerle dokunun kalınlığı ölçülebilir. Kalınlığın alan ile çarpımı sonucu hacim hesaplamasına gidilebilir. Volüm ağırlıklı hesaplamalarda bu gereklidir.

Doku kesitlerinin üst ve alt yüzleri düzgün olmadığı gibi, bu yüzlere rastlayan hücre kesitlerinde dökülme ve kayıplar söz konusudur. Optik disektör uygulanırken mutlaka dokunun üst yüzü ile alt yüzünde oluşan düzensiz hücre kalıntılarını ekarte etmek için sayılacak partikülün yarısı kadar bir mesafe, güvenlik kuşağı olarak sayım dışı tutulur.

Optik parçalama yöntemi hacim hesabından bağımsız olarak toplam hücre-partikül sayısının hesaplanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir (WEST, 1991). Yalnız burada kesit kalınlığının bilinmesi gerekir. Sayım sonrasında yapılacak hesaplamalarda optik disektör sırasında disektör kalınlığının kesit kalınlığına oranı gereklidir.



Şekil 9: Optik parçalama yöntemi ile sıçan hipokampusunda pyramidal nöron sayısının hesaplanması. Burada solda hipokampusun sistematik rastgele örnekleme yöntemi ile dilimlenmesi ve içinden örneklerin seçilmesi, sağda ise mikroskop görüntüsü üzerinde optik parçalama yöntemi ile sistematik rasgele örnekleme stratejisine uygun olarak alan seçimi, optik disektör ile hücre sayımı şematize edilmiştir (WEST, 1991).

Optik parçalama öz olarak sistematik rastgele örnekleme stratejisinin kullanıldığı bir yöntemdir. Mikroskop altında incelenen hacmin tıpkı fiziksel parçalamada olduğu gibi kısımlara ayrılıp örneklenmesi amaçlanmıştır. İlgilenilen hacimde sistematik rastgele örneklemeyle örneklenmiş belli bir parçada (fraksiyonda), disektörlerle sayım yapılır. Optik disektör ve fraksiyonlama yöntemlerinin bir kombinasyonudur. Toplam hücre sayısına ulaşıldığı için hacimsel değişimlerden etkilenmez (WEST, 1991).

GEREÇ VE YÖNTEM

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ İLE İLGİLİ İŞLEMLER

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ ÖZÜTÜ İÇİN KAYNAK SEÇİMİ

Analizlerde kullanılacak olan üzüm çekirdekleri (*Vitis vinifera* L. cv. Çalkarası) şarap atığı ve pekmez üretimi atığı olmak üzere iki farklı kaynaktan temin edildi. Deneyde kullanılacak özütün hazırlanacağı üzüm çekirdeği kaynağını belirlemek için pilot çalışma yapıldı. Bu amaçla her iki kaynaktan alınan örneklerden liyofilize özüt hazırlanarak derin dondurucuda saklandı. Her ihtiyaç halinde gerekli miktarda liyofilize özüt tartılıp uygun çözücüde (hayvan deneyleri için serum fizyolojik içinde) çözümlenerek deneyler gerçekleştirildi.

Deneyde kullanılmadan önce her iki grup çekirdekten (şarap atığı ve pekmez üretimi atığı) elde edilen özütlerin verimlilik ve antioksidan özellik testleri gerçekleştirildi. Verimli ve yüksek antioksidan özellik içeren pekmez atığı üzüm çekirdekleri deneyde kullanılmak üzere tercih edildi. Kromatografik analizlerle bu özütün, içerdiği gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları saptandı.

Aşağıda belirtilen işlemlerde kullanılan üzüm çekirdeği özütü miktarları mg liyofilize üzüm çekirdeği özütü (LÜÇÖ) olarak verildi.

EKTRAKSİYON VE LİYOFİLİZASYON

Kurutulmuş olarak temin edilen üzüm çekirdekleri, manuel olarak saplarından ayıklandı ve her iki kaynaktan alınan çekirdeklerden 10'ar gram tartıldı. Temizlenmiş çekirdeklerden elektrikli kahve öğütücüsünde (BOSCH, MKM 6000, Type KM 13) iki grup çekirdek ayrı ayrı toz haline getirildi. Toz halindeki üzüm çekirdeklerinden 2g tartılarak üzerine 20mL %70'lik metanol-su karışımı (hacim/hacim) ilave edildi ve 15 dakika ultrasonik banyoda sonikasyona maruz bırakıldı. Bu işlemin ardından 30 dakika oda sıcaklığında mekanik çalkalayıcıda karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra karışım santrifüj tüplerine konarak soğutmalı santrifüjde 4°C'de 20 dakika 8500 devir/dakika hızla santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar, pastör pipeti yardımıyla toplanarak 30 mL'lik amber cam şişelere aktarıldı. Kalan tortu üzerine %70'lik etanol-su karışımı 1:10 oranında (ağırlık/hacim) ilave edilerek ekstraksiyon işlemi tekrar edildi. Toplanan süpernatantlar amber cam şişeler içerisinde liyofilizasyon öncesinde derin dondurucuda (-20°C'de) saklandı.

Süpernatantlardaki etanol, liyofilizasyon öncesinde rotary evaporatörde (Büchi, Rotavapor) vakum altında 40°C'de (~10 dakika) uçuruldu. Koyu kıvamlı ekstrakt -70°C'de

(Sanyo) dondurulduktan sonra derin-dondurucu (Thermo M230) içerisinde liyofilize edildi. Kurutma işlemi sonunda elde edilen toz halindeki LÜÇÖ bir spatül yardımıyla dikkatli bir biçimde toplanarak amber şişeler içerisinde -24°C’de saklandı. İşlemler gravimetrik olarak takip edildi ve ekstraksiyon verimliliği işlem sonunda hesaplandı.

VERİMLİLİK VE FENOLİK MADDE TAYİNİ

Toplam fenolik madde tayininde Micro-adapted Folin Ciocalteu yöntemi kullanıldı (OZKAN, 2007). Folin Ciocalteu reagent, hacmen 1:10 oranından distile su kullanılarak seyreltildi ve analiz öncesinde amber cam şişede saklandı. Gallik asit kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 500mg/L konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı ve lineer bölgede son konsantrasyon 5-100mg/L olacak şekilde seyreltme yapıldı. 2mL örnek veya standart alındı ve üzerine 10mL seyreltilmiş FC reagent ilave edildi. Reaksiyon başlamadan 8 dakika öncesinde ve başladıktan 1 dakika sonra 8mL %20’lik sodyum karbonat ilave edildi. Karışım 2 saat karanlık bir ortamda bırakıldı. Süre sonunda absorbanslar 760nm dalga boyunda okundu. Değerlerin kalibrasyon eğrisi içine düşmesi için örnekler seyreltildi.

FERRİK DEMİR İNDİRGEME ANTIOKSİDAN GÜCÜ (FRAP) YÖNTEMİ İLE ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Thaipong ve arkadaşlarının belirttiği prosedüre göre antioksidan aktivite tayini yapıldı (THAIPONG, 2006). FRAP karışımı hazırlama amacıyla 25mL asetat tamponu (300mM), 2.5mL TPTZ (10mM) ve 2.5mL FeCl₃ (20mM) ile karıştırıldı ve kullanılmadan önce 37°C sıcaklıktaki su banyosunda tutuldu. Bu karışım deney günü taze olarak hazırlandı. Trolox kalibrasyon eğrisi için spektrofotometre küvetindeki son konsantrasyon 50µM’den düşük olacak şekilde Trolox çözeltisi hazırlandı. Deneylerde 150µL örnek veya standart 2850 µL FRAP karışımıyla karıştırılarak test tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyona karanlık bir ortamda 30 dakika devam edildi. Bu süre sonunda renkli ürünün (ferrous tripyridyltriazine complex) absorbansı 593nm dalga boyunda okundu. Örneklere ait absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinin içine düşmesi için örnekler seyreltildi.

Çalışmanın bu aşamasında farklı kaynaklardan elde edilen üzüm çekirdeklerinden, pekmez atığından elde edilenlerin hem toplam fenol içeriğinin hem de antioksidan aktivitesinin şarap atıklarından elde edilenlerden yüksek ($p < 0.05$) olduğu görüldü. Çalışmanın bundan sonraki kısmında pekmez atığından elde edilen çekirdekler kullanıldı.

FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK ANALİZ İLE TAYİNİ

Üzüm çekirdeklerinde fenolik asitlerden gallik asit ve flavanol monomerleri olan kateşin ve epikateşin baskın bileşenlerdir. Yukarıda bahsedilen yöntemle pekmez atığı üzüm çekirdeklerinden elde edilen toz ekstrakttaki bu bileşenlerin miktarı kromatografik olarak tespit edildi. Bu amaçla gradiyen (dereceli) elüsyon kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Kromatografik analizlerde kullanılan gradiyen program.

Zaman (dak)	A Oranı (%)*	B Oranı (%)
0	84	16
15	75	25
30	75	25
50	70	30
60	20	80
70	20	80

* B:%70'lik metanol:su (hacmen); A: %1'lik asetik asit:su (hacmen)

Dikkatli bir biçimde tartılan ekstrakt %70'lik sulu metanolde çözüldü. Elde edilen çözelti 0.45 mikronluk şırınga filtreden geçirildikten sonra otomatik enjektör kullanılarak HPLC cihazına (HP Agilent 1200 Series) enjekte edildi. Fotodiyot Array Dedektör (PDA) kullanılarak 280nm dalga boyunda pikler elde edildi. Gallik asit, kateşin ve epikateşin standartları Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi ve farklı konsantrasyonlarda HPLC cihazına enjekte edilerek standart kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. PDA dedektörüyle piklere ait spektrumlar farklı dalga boylarında taranarak elde edildi ve bu spektrumlar toz ürüne ait piklerin verifikasyonu amacıyla kullanıldı.

LÜÇÖ'NÜN IN VITRO VE IN VIVO OKSİDAN ve ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN GÖSTERİLMESİ

H₂O₂ Konsantrasyonunun Krokin Çözeltisi Renginin Ağarması Üzerine Etkisi

Bekletilen LÜÇÖ çözeltilerinde oksidan aktivite gelişip gelişmediğinin kontrolü için bu yönteme başvuruldu. Metanol içerisinde hazırlanan ve fosfat tamponu (pH 7) ile seyreltilen krokin çözeltisine su ve %30'luk hidrojen peroksit ilave edildi. Spektrofotometre küvetinde toplam hacim 3mL olarak baz alındı, belirtilen hacimler krokin çözeltisi ile toplam hacme tamamlandı. Seyreltmenin etkisini görebilmek amacıyla hidrojen peroksit yerine saf su kullanıldı. Hidrojen peroksit güçlü bir oksidan olduğundan ve literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda bu konsantrasyondaki hidrojen peroksitin krokin çözeltisinin rengini anlamlı

derecede açması (ağartma) beklendi. Zaman içinde değerlendirilen ağarma oranları çizgi grafik olarak yazdırıldı. Literatür bilgisi ile karşılaştırılarak ağarmanın yeterli olmadığına karar verildi. Ancak sonuçların bu raporda yer almasının gelecek çalışmalara yol göstermesi açısından önemli olduğu düşünüldü.

LÜÇÖ'nün Eritrosit Deformabilitesi Üzerine Etkisi

LÜÇÖ'nün antioksidan aktivitesinin *in vitro* ortamda kontrol edilmesi için sıçan eritrositleri kullanıldı (n=7). Genel anestezi altında aort kateterizasyonu ile sıçanlardan heparinize kan alınarak santrifugasyonu takiben (7200 rpm, oda ısısında) üst kısımda kalan plazma-lökosit ve trombosit uzaklaştırıldı. Kalan eritrositler serum fizyolojik ile iki kez yıkandı. Serum fizyolojik içinde kalan eritrosit süspansiyonu hematokrit %40 olacak şekilde 1/1 Lv:v resuspanse edildi. Hazırlanan eritrosit süspansiyonları her bir sıçan için üç tüpe ayrıldı. Birinci tüpe oksidan stres yaratmak üzere hidrojen peroksit eklendi (H₂O₂, 10mM, inkübasyon süresi 1 saat 37°C); ikinci tüpe hidrojen peroksit ve üzüm çekirdeği özütü (10mg/ml, 1 hour, 37°C) eklendi; üçüncü tüp ise kontrol olarak tutuldu. Eritrosit deformabilitesi ektasitometre (LORCA) kullanılarak ölçüldü (Hardeman, 1994).

LÜÇÖ'nün Sıçan Serum ve Beyin Dokusunda Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status (TAS, TOS) Üzerine Etkisi

Üzüm çekirdeği özütünün antioksidan aktivitesinin *in vivo* olarak kontrol edilmesi için serum fizyolojik içinde çözülmüş LÜÇÖ (50mg/kg, ph:7.4) intraperitoneal olarak bir grup erişkin sıçana uygulandı, diğer bir grup ise kontrol olarak alındı (her grup için n=6). Uygulamadan bir saat sonra genel anestezi altında aorta abdominalis kateterizasyonu ile sıçanlardan heparinize kan alındıktan sonra sol ventriküle yerleştirilen kanül aracılığı ile 0-4°C soğutulmuş serum fizyolojik kullanılarak damarlar yıkandı. Kraniyotomi ile beyinin tamamı çıkartıldı, kullanılmaya kadar -20°C saklandı. Heparinize kanlar ise santrifugasyona tabi tutulup (7200 rpm, oda ısısında) plazmaları ayrıldı ve her sıçan için 1ml plazma kullanılmaya kadar -20°C saklandı. Beyinlerin soğuk ortamda diseksiyonu yapıp her iki taraflı hipokampusları çıkartılıp 9 mL 50 mmol fosfat tamponu içinde teflon uçlu homojenizatör yardımı ile soğuk ortamda homojenize edildi. Elde edilen homojenat santrifujle (7200 rpm, oda ısısında) çevrildikten sonra üstte kalan supernatantdan 1mL alındı. Plazma ve beyin dokusunda TAS, TOS ticari kit kullanılarak saptandı (Rel Assay Diagnostic®, Turkey) (EREL, 2004; EREL, 2005). Çalışılan TAS-TOS beyin değerleri Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldıktan sonra doku başına mg olarak ifade edildi

(LOWRY, 1951). Elde edilen değereler kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı, hesaplamada $[OSİ=(TOS/TAS)*100]$ formülü kullanıldı.

Elde edilen sonuçlarda beyin dokusunda kontrol grubuna göre farklılık bulunamayınca yeni iki grup sıçanda (her grup için n=5) deney tekrar edildi. Bu uygulamada tedavi grubuna yedi gün süre ile aynı dozda LÜÇÖ uygulandı.

HİPOKSI-İSKEMİK ENSEFALOPATİ (HİE) MODELİ

HAZIRLIK UYGULAMALARI

(Deneyin Ön Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar, LÜÇÖ Uygulama Rejiminin Saptanması)

Erişkin sıçanlarda daha önce yapılan denemelerde tek dozluk LÜÇÖ uygulamanın beyin dokusundaki total antioksidan kapasiteyi artırmamasına dayanarak doğum öncesi gebe sıçanlara 6-7 gün süre ile intraperitoneal LÜÇÖ enjeksiyonu, doğumdan sonra ise yavrulara 3-12. günler ve hipoksi-iskemi sonrası ilk 4 gün 50 mg/k g/gün LÜÇÖ enjeksiyonuna karar verildi (Bknz. Bulgular, Tablo 7-9).

Deneyin uygulanması amacı ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi Laboratuvarı (DEAB) ile gerekli hazırlıklar yapılarak damızlık dişiler ve erkek sıçanlar (Wistar Albino) çiftleşmeye bırakıldı. Vajinal simir yöntemi ile sperm saptanan dişiler ayrıldı ve tarih gebeliğin ilk günü (0.gün) olarak not edildi. Bu uygulamadaki ilk atımda üç gebe sıçan elde edilebildi. Gebeliğin 16. gününden itibaren doğuma kadar (7 kez) her gebe sıçana intraperitoneal olarak serum fizyolojik içinde çözülmüş 100mg/k g/gün (pH:7.4) LÜÇÖ enjekte edildi. Ekstrakt solusyonu her uygulamadan önce taze olarak hazırlandı. Bu grupta doğum ve erkek-dişi yavru dağılımı sıra ile 2-4, 1-3 ve 3-5 olacak şekilde gerçekleşti.

İkinci atımda yedi sıçanda gebelik saptandı. Bir gebe sıçan çok agresif olması nedeni ile herhangi bir işleme tabi tutulmaz iken diğer altı sıçana gebeliğin 16. gününden itibaren intraperitoneal yoldan 100mg/k g/gün LÜÇÖ enjeksiyonu yapıldı. Hayvan sayısının çok olması, gereken solüsyon miktarının fazla olması nedeniyle enjekte edilecek LÜÇÖ solüsyonu stok olarak hazırlanıp +4 °C'de saklandı. Bu gruptaki bir sıçan LÜÇÖ enjeksiyonuna başlanmasının 3.gününde (gebeliğin 19.günü) öldü. Doğum yapan iki sıçandan birisi sadece bir yavru doğurdu ve bu yavru bir gün sonra öldü. Doğum yapan ikinci sıçan ise üç yavru doğurdu ve yavrular yaşamaya devam etti. Geriye kalan üç gebe sıçan ise süreleri dolmasına karşın doğum yapmadı ve karın içinde yavru ölümleri gelişti. Enjeksiyon yapılmayan bir gebe sıçan ise 10 sağlıklı yavru doğurdu.

Bu sonuca dayanarak stok olarak kullanılan özüt solüsyonunun zaman içinde polimerizasyona uğrayarak oksidan özellik kazanabileceği düşünüldü. Sorunun aydınlatılabilmesi için stok ve taze hazırlanmış özüt solüsyonlarında TAS ve TOS tayini yapıldı (Bknz. Sayfa 26).

İlk atımdan elde edilen altı erkek yavruya 3.günden itibaren intraperitoneal olarak 50mg/kg özüt enjeksiyonuna devam edildi. Dört yavru doğum sonrası 12. günde genel anestezi ile uyutuldu (ketamin, xilasine). Biyomikroskop altında boyun ön yüzüne, sol yanda yaklaşık 0,4 cm kesi ile girilerek fasya ve kaslar ekarte edildi. Sol A.carotis communis bulundu, 6/0 cerrahi suture kullanılarak askıya alınıp, kalıcı olarak bağlandı. İki yavruda ise aynı şartlarda a.carotis communis bulduktan sonra bağlanmadan bırakıldı. Kesi yerleri cerrahi suturele kapatılıp yavrular anaç sıçanların yanına bırakılıp uyanmaları beklendi. Yavrular uyanmalarını takiben (yaklaşık 1 saat) dakikada 5 litre %8 oksijen %92 nitrojen karışımı verilen kabinde birbuçuk saat bekletildiler. Ancak bu süreçlerde yavruların büyük bir kısmının ölmesi üzerine deney sonlandırılarak bu yavrular deney dışı bırakıldı.

Bu tecrübe sonucunda LÜÇÖ enjeksiyonu rejiminde değişikliğe gidildi. Gebelik sırasında anaçlara LÜÇÖ enjeksiyonundan vaz geçildi, yavrulara yapılan enjeksiyon süreleri kısaltıldı.

Yavru Sıçanların Elde Edilmesi

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi Laboratuvarı (DEAB) ile gerekli hazırlıklar yapılarak üç damızlık dişi ve bir erkek sıçan (Wistar Albino) olacak şekilde ayrı kafeslerde çiftleşmeye bırakıldı. Her sabah yapılan vajinal lavaj-aspirasyonlarında sperm saptanan dişiler ayrıldı ve tarih gebeliğin ilk günü (0.gün) olarak not edildi. Sonuçta toplam sekiz gebe sıçandan 30 erkek yavru elde edildi. Ön çalışmalarda ortaya çıkan anne ve yavru kayıplarına yol açmasından dolayı gebe sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı, sıçanlar normal gebelik seyrine bırakıldı.

Elde edilen otuz yavru erkek sıçan dört gruba ayrılarak kuyrukları kalıcı boya ile işaretlendi. HİE uygulanan ve LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan gruplarda ölümler görüldüğü için bu gruplara ayrılan sıçan sayısı fazla tutuldu:

- 1.Grup (n=10): HİE ve sonrasında beş gün 50 mg/kg/gün üzüm çekirdeği özütü enjekte edilen grup.
- 2.Grup (n=9): Beş gün 50 mg/kg/gün sadece üzüm çekirdeği özütü enjekte edilen grup
- 3.Grup (n=5): Kontrol grubu (Yalancı operasyon).

4.Grup (n=6): HİE ve intraperitoneal % 0.9 NaCl uygulanan grup.

Yavru Sıçanlara LÜÇÖ Enjeksiyonu ve HİE Uygulanması

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 Xilazine+8,5 cc serum fizyolojik solusyonundan 10 gram canlı ağırlık başına 0,2 cc karışım) modifiye Levin modeli HİE uygulandı (LEVINE, 1960; VANNUCCI, 1990). Bu işlem için biyomikroskop altında sıçan yavrularının boyun ön yüzü, sol yandan yaklaşık 4 mm 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 (Şekil 10). Üçüncü gruba ise aynı şartlarda a.carotis communis bulunduktan sonra bağlanmadan bırakıldı. Kesi yerleri cerrahi suturele kapatılıp yavrular anaç sıçanların yanına bırakıldı, uyanmalarını bekledi. Uyanmalarını takiben 1. ve 4. gruptaki yavrular (yaklaşık 1 saat sonra) dakikada 5 litre %8 oksijen %92 nitrojen karışımını verilen kabinde bir buçuk saat bekletildi. Ortam sıcaklığı uygulamalar boyunca 33°C civarında tutuldu.

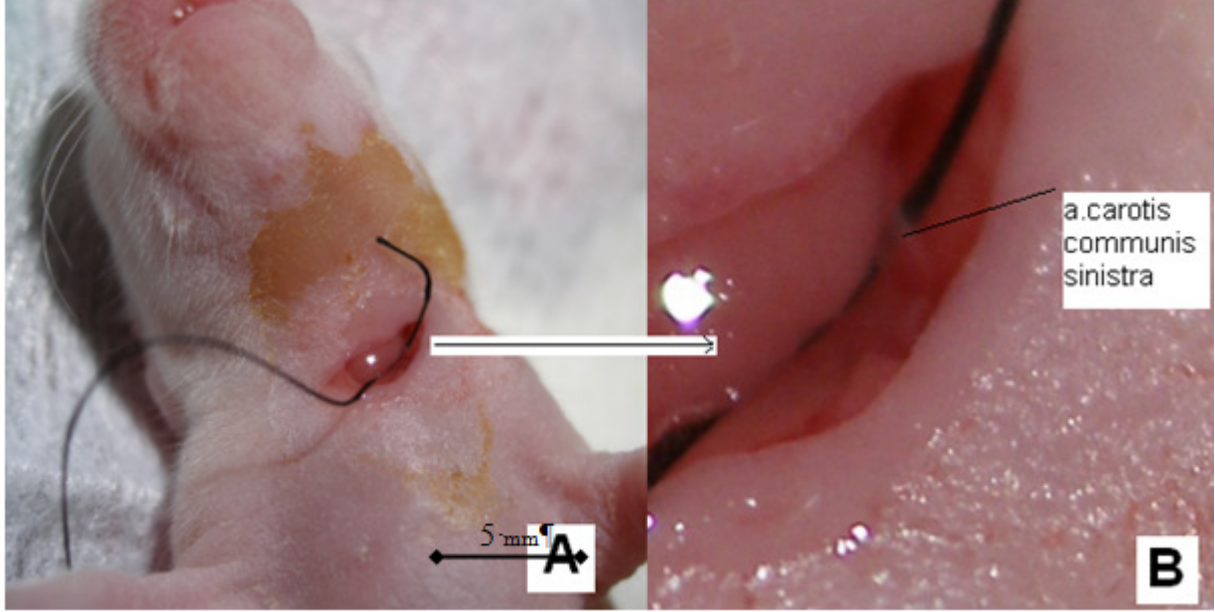
Daha sonraki süreçte yavrular süt alımının kesildiği güne kadar anaç kafeslerinde tutuldu. Kendi kendilerine beslenmeye başlamalarından sonra aynı grupta olan sıçanlar ortak kafeslerde bakıma alınarak öğrenme testlerinin yapılacağı süre tamamlanıncaya kadar beklemeye alındılar (6-8 hafta).

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 (MORRIS, 1981; HOZ, 2005). 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

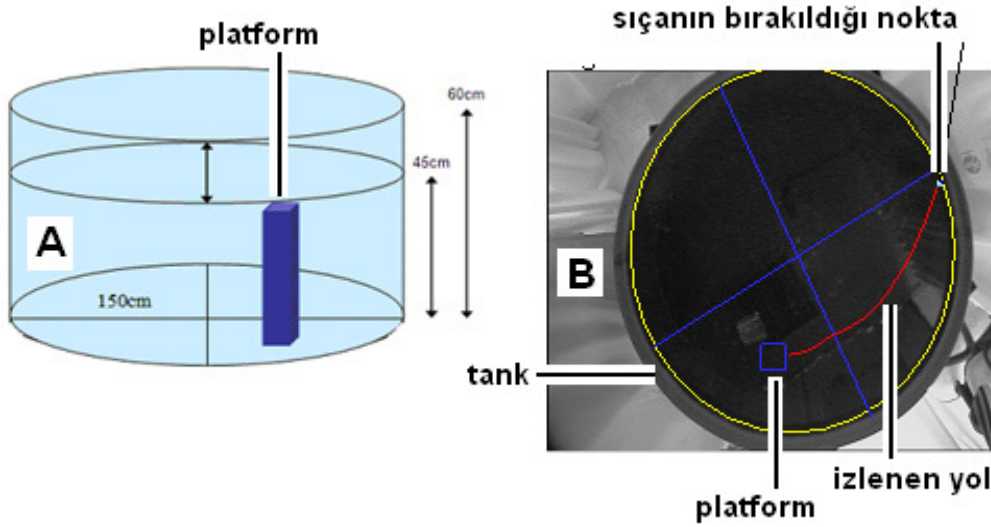
lokalisasyon için kullanılabilir, görsel cisimler yerleştirildi. Test boyunca çevre düzeni değiştirilmedi ve test her sıçan için günün aynı saatlerinde tekrarlandı (Şekil 11).



Şekil 10: 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).

Testin uygulanması: Su tankı kendi içinde 4 farklı sanal kadrana; kuzey batı (KB), kuzeydoğu (KD), güney batı (GB) ve güneydoğu (GD) ayrıldı. Platform, kadranlardan birinin ortasına sabit pozisyonunda yerleştirildi.

Testin başlangıcında (1.gün) sıçanlara alıştırmaya yaptırıldı (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 üç kez tekrarlandı. Buradaki kayıtlar istatistiksel değerlendirilmedi kullanılmadı.



Şekil 11: 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 (G.N.Yonuç'un izni ile).

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 kadrant 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 30 sn süreyle platform üzerinde kalması sağlandı. Her deneme sonunda sıçanlar kafeslerine alındı. Denemeler kamera yardımıyla bilgisayara aktarılarak Ethovision 3.1 bilgisayar programıyla analiz edildi (Şekil 12).

Her sıçanın, denemelerdeki performansı,

- denegin platforma ulaşması için geçen zaman,
- platforma ulaşmak için kullanılan yol uzunluğu ve
- hızı olmak üzere üç parametre açısından değerlendirildi.



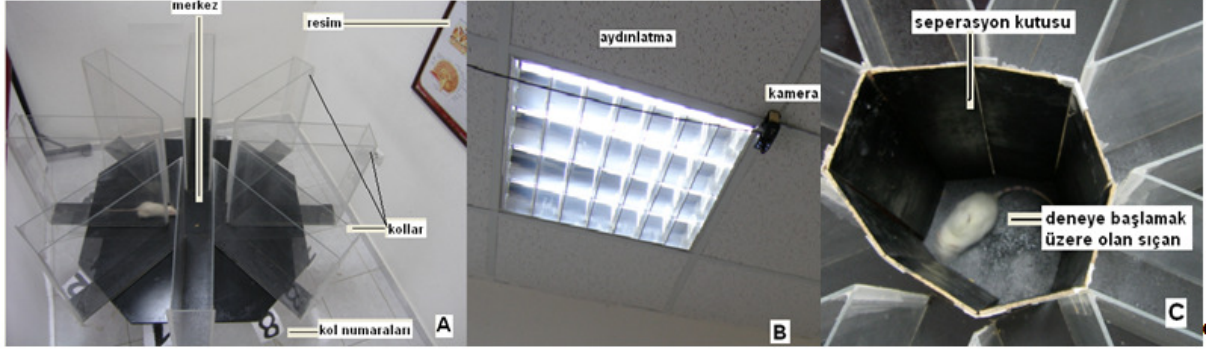
Şekil 12: Şekilde bir sıçanın testin başında ve sonunda platformu bulmak için kat ettiği yol yeşil çizgi ile gösterilmiştir görülmektedir (G.N.Yonguç'un izni ile).

Sekiz Kollu Labirent Testi (Radial Eight-Arm Maze) Uygulaması

Sekiz kollu labirent uygulaması için kullanılan labirentin özellikleri daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (OLTON, 1976). Dairesel çapı 24 cm olan 10 cm'lik kenarlara sahip bir sekizgen tablanın tüm kenarlarına eklenmiş sekiz koldan oluşmaktadır. Her kolun genişliği 10 cm, uzunluğu 50 cm'dir. Tüm kolların ve merkezdeki sekizgen tablanın tabanı siyah renkli suntalam malzemeden yapılmıştır. Zemin yarı mat, orta kayganlıktadır. Tüm kolların etrafı, 50 cm yüksekliğinde saydam plastik duvarla çevrilmiştir. Bu haliyle labirent, 1 m çapında sekizgen bir tabla üzerine yerleştirilerek yerden 50 cm yükseltildi (Şekil 13-A). Her kola 1'den 8'e kadar sıra numarası verildi. Her kolun uç kısmının ortasına, 3 cm çapında 1cm yüksekliğinde metal, siyah renkli yem kapları konuldu. Ayrıca sıçanların teste başlaması öncesinde içine konulacağı, opak malzemeden yapılmış 50 cm yüksekliğinde yaklaşık 24 cm çapında iki ucu açık sekizgen bir kutu kullanıldı (seperasyon kutusu, Şekil 13-C). Çalışmanın yapılacağı odaya, sıçanların görebileceği şekilde, labirentin kenarlarından 50 cm uzağa, görsel cisimler yerleştirildi (Şekil 13-A), aydınlatma olarak kullanılan dört adet 50 cm uzunluğunda standart floresan ışık ve kayıt kamerası labirentin üst kenarından yaklaşık 2 m yukarıda konumlandırıldı (Şekil 13-B). Öğrenme testleri boyunca bu çevre düzeni ve aydınlatma korundu.

Bu testin uygulanmasından önce sıçan kafeslerindeki günlük yem tüketimi ölçülerek, iki hafta süreyle her kafese tüketimin yaklaşık %80'i kadar yem konuldu. Böylece hayvanların ağırlıklarında %15-18 oranında bir kayıp sağlandı.

Labirent, bir gruba ait sıçanların testine başlamadan önce %0,1'lik sirke solüsyonu ile silinerek ortam temizlendi. Labirent içine herhangi bir sıçanın dışkılanması durumunda bu işlem grup değişimini beklemeksizin tekrarlandı.



Şekil 13: Sekiz kollu labirent testinde kullanılan malzeme ve ekipmanlar. Örnek olarak labirent içinde ve seperasyon kutusunda sıçan görülmektedir. A: Labirent düzeneği ve duvar resimleri, B: Aydınlatma ve kayıt kamerası, C: Seperasyon kutusu.

Testin başlangıcında ortama alışmaları için labirent içine normal yem parçaları konularak, her seferde en fazla 5 hayvan olacak şekilde (deney grupları birbirine karıştırılmadan) sıçanlar gruplar halinde 10'ar dakika labirent içinde tutuldular (pretraining). Günde üç kez (bir saatlik aralarla) olmak üzere üç gün süreyle bu işleme devam edildi. Dördüncü gün sıçanlar dinlenmeye bırakıldı. Bu süre zarfında herhangi bir kayıt veya test yapılmadı. Beşinci gün ise teste başlandı (Training).

Test için her kolun uç kısmındaki yem kaplarına 50–60 mg tek parça olarak, sıçanları cezbeden kahverengi şeker parçası bırakıldı. Sıçanlar, sekiz kollu labirentin ortasına konulan seperasyon kutusu içine yerleştirildi ve bir dakika sonra, kutu kaldırılarak sıçanın labirent içinde serbest dolaşması sağlandı. Sıçanın dört ayağıyla bir kola girmesi durumunda kol ziyaret edilmiş sayıldı. Kamera yardımıyla sıçanın davranış görüntüleri bilgisayara kaydedildi. Sıçanların her kolu ziyaretlerini “zaman, seçim sayısı ve girilen kol numarası” üçlüsü olarak kaydedebilen ekip tarafından geliştirilen bir yazılım (Amonra Stop Watch) kullanılarak veriler hem video görüntüsü, hem de yazılı doküman olarak kaydedildi (Şekil 14).

Bir sıçanın bir seferlik çalışması (training), sıçan 8 kolun hepsini ziyaret etmesi durumunda veya kol ziyaretini tamamlayamaması durumunda 10. dakika sonunda sonlandırıldı. Bu uygulama her sıçana günde üç kez (bir çalışma turu; birer saat arayla yapılan üç tekrar) olmak üzere 14 gün boyunca sürdürüldü.

Sıçanların her kola ilk girişleri *doğru seçim* (DS), herhangi bir kola ikinci ve daha sonraki tekrar girişleri ise *yanlış seçim* veya *kol hatası* (YS) olarak değerlendirildi. Yanlış kollara birden fazla girişlerin toplamı ise *toplam hata* olarak değerlendirildi. Sıçanın her

turdaki performansı, *doğru seçim*, *kol hatası*, *toplam hata* ve tüm sekiz kolu ziyaret edene kadar *geçen süre* (running time) olmak üzere dört parametre üzerinden değerlendirildi.



Şekil 14: Bilgisayar ekranından alınan bu görüntüde solda kamera kaydı, sağda ise sıçanın kolları ziyaret ettiğinde zaman ve kol numarasını kayıt için kullanılan (Amonra Kronometre) eden kronometre görülmektedir.

PERFÜZYON, DEKAPİTASYON, KRANYOTOMİ VE DONDURMA-KESME İŞLEMLERİ

Deney planına uygun olarak dört gruba ayrılan erkek sıçan yavruları erişkin hale gelip davranış testleri tamamlandıktan sonra genel anestezi altında perfüzyon ile fiksasyon ve dekapitasyon işlemlerine başlandı. Her defasında, her gruptan birer sıçan olacak şekilde işleme devam edildi. Tartılan sıçanlarda intraperitoneal xilazin/ketamin enjeksiyonu ile genel anestezi oluşturuldu. Anestezi altındaki sıçana torakotomi yapılarak kalp ortaya çıkartıldı, sol ventriküle kanül yerleştirildikten sonra sağ atrium kesilip kan dışarı akıtılarak perfüzyona başlandı. Yaklaşık 100 ml. %0.9 NaCl 5-8 dk. içinde uygulandı. Sağ atriumdan gelen sıvı berraklaşınca 0,1 M fosfat tampon (PB, pH 7.4) içinde %4' lük paraformaldehid eriyiği ile perfüzyona devam edildi (600 ml). Her iki solüsyon da +4° C' de, serbest perfüzyon şeklinde uygulandı. Tespit sıvısının ilk 200 ml' si hızlı, geri kalan 400 ml.' si daha yavaş olarak verildi (2 saat). Fiksasyon sıvısının perfüzyonuna başladığında tipik kas kasılmaları gözlenerek perfüzyonun amacına ulaştığı kanıtlandı. Daha sonra kranyotomi ile çıkartılan beyinler tartıldı ve +4°C' de aynı tespit solüsyonu içinde üç gün bekletildi. Tespit olan beyinler aynı soğuk ortamda %30' luk sükröz solüsyonuna alınarak üç gün bekletildi. Sükröz solüsyonundan

çıkartılan beyinler kriyostat cihazında -15°C dondurularak 50µm kalınlığında seri kesitler alındı.

STEREOLojİK YÖNTEMLERLE HİPPOCAMPUS CA3-2 TABAKASINDA PYRAMİDAL HÜCRE SAYIMI

Sistemik Rastgele Örnekleme Stratejisinin Planlanması ve Kesit Örnekleme Oranı

Stereolojik yöntemlerin temel ilkelerinden olan sistemik rastgele örnekleme stratejisi, belli bir örnekleme aralığı ile ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlanmak şartıyla, ilgilenilen yapının tamamının örneklenmesidir. Sistemik rastgele örnekleme stratejisi stereolojik çalışma yapılacak organdan örnek alınacak tüm seviyelerde (organdan alınacak dilimlerde, dilimlerden alınacak bloklarda, bloklardan alınacak kesitlerde ve kesitlerde inceleme yapılacak alanlarda) uygulanmalıdır. Sıçan beyinleri göreceli olarak küçük yapılar olduğu için bu çalışmada örnekleme mikrotom ile kesitlerin alınması aşamasında başlandı. Her 12 kesitten bir tanesi örnek olarak alındı. Dört ayrı boya kullanıldığı için her 12. kesitten itibaren birinci kesit cresyl violet, ikinci kesit parvalbumin, üçüncü kesit calretinin, dördüncü kesit NeuN boyaları için ayrıldı. Toplam hücre sayısının hesaplanmasında kullanılacak olan kesit örnekleme oranı (KÖO) 1/12 olarak gerçekleşti.

İmmunohistokimyasal ve Histokimyasal Boyama Yöntemleri:

Çalışmada histokimyasal boya olarak kresil vıyole (cresyl violet) kullanıldı. Kesitler (dokular) sırası ile %100, % 100, % 70 ve % 50' lik alkol karışımlarında hidrate edildikten sonra 2 dk. cresyl vıyole boyasında bekletildi. Kesitler yıkandıktan sonra sırası ile %50, % 70, % 100 ve % 100' lük alkol karışımlarında dehidrate edildi. Entellan ile kapatılarak kurutuldu.

İmmunohistokimyasal Yöntem:

Kriyostat aletinde alınan donmuş dokular %100' lük alkolde tespit edildi. Tespit edilen kesitler 'retrival' solusyonu içinde mikrodalga fırında kaynamaya izin verilmeden on dakika 'retrival' işlemine tabi tutuldu, sonra distile su ile yıkanarak retrival solusyonundan temizlendi ve kesitlerin üzerine hidrojen peroksit damlatıldı. Daha sonra PBS ile yıkanarak hidrojen peroksit uzaklaştırıldı. 'Blocking' solusyonu damlatılması işleminden sonra PBS ile yıkama tekrarlandı. Doku kenarları özel kalem ile işaretlenerek damlatılan sıvının akması engellendikten sonra Parvalbumin, Calretinin ve NeuN için ayrılan kesitlere uygun primer antikolar (Anti Parvalbumin: Millipore[®] Cat. #MAB1512, Anti Calretinin: Millipore[®] Cat. #AB5054 ve NeuN: Millipore[®], NEUronal Nuclei clone 60, Cat. #MAB77B) daha önce saptanan dilüsyonlarda damlatılarak kesitler shaker üzerinde +4° C de 24 saat çalkalanarak

bekletildi. Ara kontrollerle üzerinde kuruma olan kesitlere tekrar antikor solüsyonu eklendi. İşlemin sonunda Tekrar PBS ile yıkama yapıldıktan sonra dokulara yine shaker üzerinde bu kez sekonder antikor uygulandı (Invitrogen® Cat. 85-9043) .

Dokular son kez PBS ile yıkanarak Peroksidaz kompleksi ile inkübe edildi.

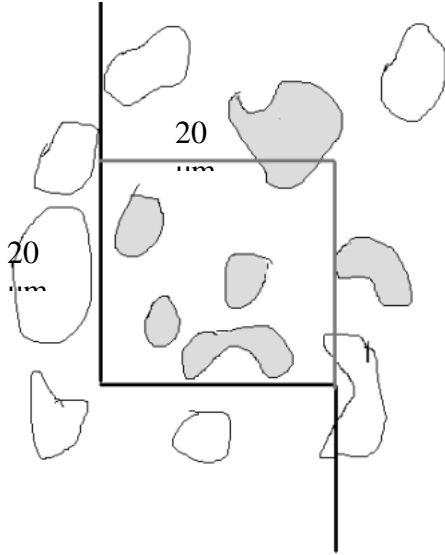
Distile su ile yıkama ve Kromojen uygulaması yapıldıktan hematoxylen ile zıt boyama yapıldı.

Daha sonra %100'lük alkolden ve ksilenden geçirilen dokular immun boyanma açısından ışık mikroskopunda incelendi.

Tarafsız Sayım Çerçevesi ve Optik Disektörün Uygulanması

Bu çalışmada 20X20 mikrometrekare boyutlarında bir tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı (Şekil 15).

Disektör, görüntü çiftleri kullanılarak (iki boyutlu görüntü) üç boyutlu yapı hakkında bilgi edinme uygulaması için kullanılmaktadır (104). Ardışık kesitlerde fiziksel olarak fotoğraf veya monitör görüntülerinin yan yana getirilmesinin güçlüğü nedeniyle, yöntemin uygulanmasında kolaylık sağlayan optik disektör yöntemi tanımlanmıştır (GUNDERSEN, 1986). Bu çalışmada kullanılan optik disektör kalınlığı 30µm olarak belirlenmiştir.



Şekil 15: 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.

Optik Parçalama (Fraksiyonlama) Yönteminin Uygulanması

Yöntem olarak örnekleme stratejisi ile ilgili istatistiksel yöntemler ve optik disektörün birlikte kullanıldığı bir yöntemdir. Bu çalışmada kullanılan örnekleme stratejisine göre yapılan işlemler aşağıda yer almaktadır.

Alan Örnekleme Oranı

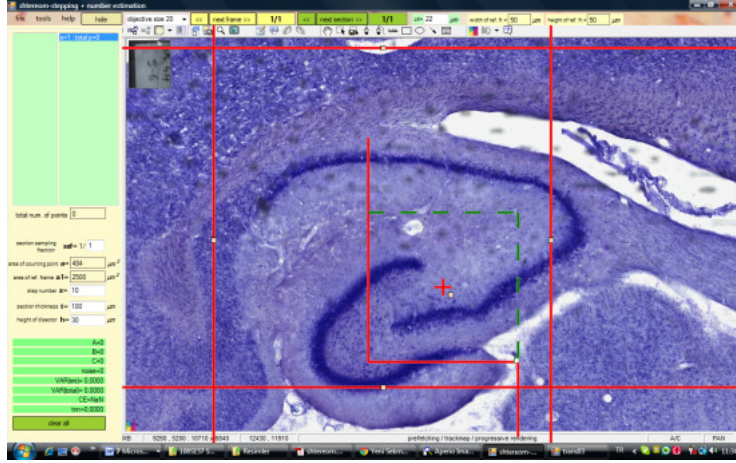
Sistemik rastgele örnekleme ile seçilen kesitlerden ilgilenilen bölgenin alanı mikroskopta belli aralıklarla x ve y eksenleri boyunca ölçülmüş alanlara ayrılarak tarandı (adımlama). Hücre sayımı her adımlama sonunda tarafsız sayım çerçevesi içerisinde yapıldı. Buna göre toplam hücre sayısını hesaplamak için gerekli bir başka parametre alan örnekleme oranı, tarafsız sayım çerçevesi alanının x, y adımlama alanına bölünmesi ile belirlendi. Adımlama için 50X50 μm^2 lik bir çerçeve hipokampus üzerinde on kez ilerletildi. Onuncu adımda 20X20 μm^2 tarafsız sayım çerçevesi içinde sayım yapıldı. Bu işlem için ekibimiz tarafından geliştirilen SHTEREOM[®] yazılımı kullanıldı (OGUZ, 2007; ADIGUZEL, 2003). x, y adımlama alanını belirlemek için kesitler mikroskoba (Nicon Eclipse E 600) yerleştirildi. Görüntüler mikroskoba monte edilmiş video kamera (Hitachi[®] OSP Color Video Camera VK-C220E) ile SHTEREOM[®] yazılımı yüklenmiş ve ekran kalibrasyonu yapılmış bilgisayar ekranına aktarıldı. Hipokampus pyramidal hücre tabakası 4X büyütmede bulundu. SHTEREOM[®] Programının alan hesaplama modülü açıldı. İlgili alan üzerine program yardımı ile 50X50 μm^2 lik grid atıldı. Rastgele bir başlangıç seçilerek ilgili tabaka üzerine düşen her 10 alandan bir tanesi seçilerek tarafsız sayım çerçevesi ile sayıma geçildi. Sayım işlemi mikroskop objektifi X100 (sayısal açıklık 1.25) büyütme getirilerek SHTEREOM[®] Programının hücre sayım modülü yardımı ile gerçekleştirildi (Şekil 16).

Böylece iki eksendeki adımlama alanı (x, y adımlama 50X50X10) 25 000 μm^2 , tarafsız sayım çerçevesinin alanı 400 μm^2 olduğu için alan örnekleme oranı (AÖO) $400 \mu\text{m}^2 / 25\ 000 \mu\text{m}^2 = 4/250$ olarak bulundu.

Kesit Kalınlığının Ölçümü ve Kesit Kalınlığı Örnekleme Oranı (KKÖO)

Kesit kalınlığı ölçümünde mikroskop tablasına monte edilmiş mikrokator kullanıldı (HEIDENHAIN[®]). Her kesitte rastgele beş ayrı alan seçildi, 100X büyütmede kesit görüntüsünün üst yüzünde elde edilen görüntü netliği ölçümün başlangıç noktası kabul edildi. Görüntü netliği kesitin alt yüzüne doğru hareket ettirilerek mikroskop tablasının z eksenindeki (derinlik) hareketi ölçüldü. Böylece elde edilen doku kalınlıklarının ortalamaları alındı. SHTEREOM[®] programında kesit kalınlığı bölümüne bu ortalamalar yazıldı. Bu çalışmada 50

μm kalınlığında kesitler alındı. Perfüzyon ile fiksasyon ve sonrasında sükröz solüsyonu içinde dehidratasyon yapıldığı için kesilerde önemli bir kalınlık farkı oluşmadığı gözlemlendi. Kesitin alt ve üst yüzlerinden $10 \mu\text{m}$ bölümler sayım dışı tutuldu. Böylece kesitin kesilme



Şekil 16: SHTEREOM[®] yazılımında hücre sayım modülünün demonstratif görüntüsü. Büyüklüğü $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ olan adımlama alanını ve içinde $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ büyüklüğünde tarafsız sayım çerçevesi görülmektedir. Her on adımda bir tarafsız sayım çerçevesi yardımı ile sayım yapıldığı için $25000 \mu\text{m}^2$ adımlama alanı içinde $400 \mu\text{m}^2$ alanda sayım gerçekleştirilmektedir.

yüzeyindeki fiziksel bozukluk nedeniyle oluşabilecek artefaktlar giderilmiş oldu (güvenlik kuşağı). Aynı zamanda ardışık kesitlerde, sayılan bir nöronun tekrar sayılması da engellendi. Kesit kalınlığı içinde belli bir kalınlık alındığı için ($30/50 \mu\text{m}$) KKÖO 3/5 olarak belirlendi.

Toplam Hücre Sayısının Hesaplanması

Bir beyinde yukarıda açıklanan örneklenmiş hacimlerde sayılan hücre sayısı Σp olarak temsil edildiğinde:

Toplam hücre sayısı (TNN) = $\Sigma p \cdot 1/KÖO \cdot 1/AÖO \cdot 1/KKÖO$ çarpımı ile bulundu. Elde edilen sonuçların hata katsayıları (HK; coefficient of error, CE) hesaplandı (GUNDERSEN, 1988).

$$CE (HK) = \sqrt{[(3A+C-4B)/12] / \Sigma Q^-} \quad (\text{Bknz Tablo 3})$$

Q-: Kesite ait disektör partikül sayısı,

ΣQ^- : Toplam disektör partikül sayısı,

Q-+1: Bir sonraki kesite ait disektör partikül sayısı,

Q-+2: İki sonraki kesite ait disektör partikül sayısı,

Bu hesaplamalar çalışmamızda kullandığımız bilgisayar programı yardımı ile yapıldı. SHTEREOM[©] ile elde edilmiş bir sıçana ait tablo aşağıda sunulmuştur (Tablo 3).

Tablo 3: SHTEREOM[©] programı yardımı ile elde edilmiş, bir sıçana 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 (tnn) yer almaktadır.

shtereom [©]				
stepping	+number estimation	date	time	
		02.05.2011	12:44:39	
section no, i	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			
TNN=	823.500			
toplam nöron				

İMMUN BOYANMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Beyin kesitlerinde hipokampus CA3-2 alanları her sıçan için dört kesit taranarak immun pozitif veya negatif ayırım yapılmadan yüz piramidal hücre sayıldı. İmmun pozitif hücrelerde ayrıca boyanma yoğunluğu semikantitatif bir yöntem olan H-SCORE kullanılarak değerlendirildi (ERSOY, 2009; LI, 2011; LEE, 2011). Bu skorlama sistemine göre sayılan yüz hücre içinde hiç boyanmayanlara sıfır değeri verilirken, az boyanma alanlar 1, orta boyanma alanlar 2 ve çok boyanma alanlar 3 değeri verilerek her gruba ait hücre sayısı ayrıca kaydedildi. Bir, iki ve üç değeri alan hücrelerin sayısı (yüzde oranı) kullanılarak H-SCORE = $\sum P_i (i + 1)$ formülü ile hesaplandı.

i = boyanma yoğunluk değerini (1, 2 ve 3)

Pi= yoğunluk değeri alan hücre oranını

Her yoğunluk değeri için yapılan çarpma işlemi sonuçlarının toplamı ise H-SCORE olarak ifade edildi.

Örneğin bir hayvanda 1+ boyanan hücre oranı %20, 2+ boyanan hücre oranı %10, 3+ boyanan hücre oranı %5 ise

$$HSCORE= [20X (1+1)]+ [10X (2+1)]+ [5X (3+1)] = 40+30+20 = 90$$

Yüz hücre içinde immun pozitif hücrelerin sayıları ise boyanma oranı olarak değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistik analiz için tüm sayısal veriler bilgisayar ortamına girildi. SPSS istatistik programı (10.0 versiyonu) yardımı ile istatistik analizleri yapıldı. Kantitatif verilerde varyansların homojenliği için Levene testi kullanıldı. Homojen dağılım gösteren veriler için ikili grup karşılaştırmalarda bağımsız değişkenlerde t-Testi uygulanarak ortalamalar arasında fark olup olmadığı test edildi. Çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA ve Post Hoc Bonferroni testleri uygulandı. Dağılımın homojen olmadığı durumlarda ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi, çoklu karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testi ile grupların ortalama değerleri arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı araştırıldı.

Öğrenme testi gibi tekrarlanan ölçümlerde ise tekrarlayan ölçümlerde ANOVA ve Post Hoc Bonferroni testi uygulandı. Anlamlılık sınırı tüm testler için 0,05 kabul edildi.

BULGULAR

LÜÇÖ ELDE EDİLMESİ, İÇERİK VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

Ekstraksiyon Verimliliği ve Fenolik Madde Tayini

Micro-adapted Folin Ciocalteu yöntemi ile hesaplanan toplam fenol ve flavonoid içeriği aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi saptandı. İşlemler gravimetrik olarak takip edildi ve ekstraksiyon verimliliği işlem sonunda hesaplandı (Tablo.4). Toz haldeki ekstraktın ekstraksiyon verimliliği %1.12 olarak bulundu. Yani, %70'lik etanol (hacmen) ile hazırlanan 100 mL sulu ekstrakt liyofilize edildiğinde elde edilen toz ürünün ağırlığı 1.12g olarak gerçekleşti.

Tablo 4: Pekmez atığı üzüm çekirdeklerinde fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimliliği.

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

FRAP Cinsinden Antioksidan Aktivite Tayini

Pekmez üretiminden elde edilen *Vitis vinifera* L. cv. Çalkarası çeşidi üzüm çekirdeklerinin şarap atığından elde edilen cinsine göre toplam fenolik madde içerikleri ile FRAP cinsinden antioksidan aktivitelerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$, Tablo 5).

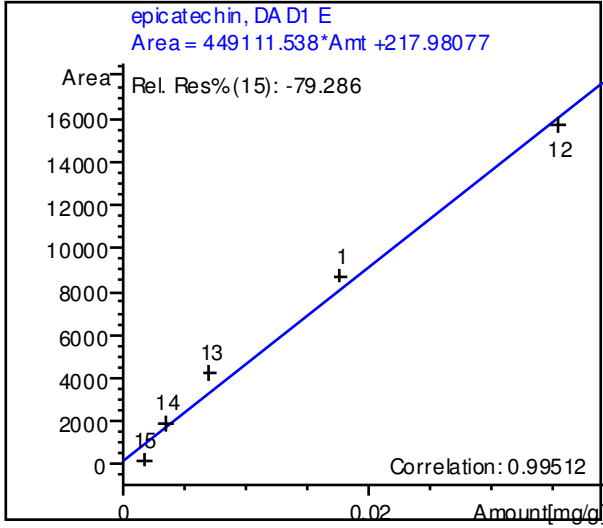
Bu bulgular sonucunda çalışmanın devam eden bölümünde pekmez atığı üzüm çekirdeklerinden elde edilen özüt tercih edildi.

Tablo 5: Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Üzüm Çekirdeklerinin Ortalama Fenolik Madde İçerikleri (kuru madde bazında) ve antioksidan aktiviteleri (FRAP yöntemiyle).

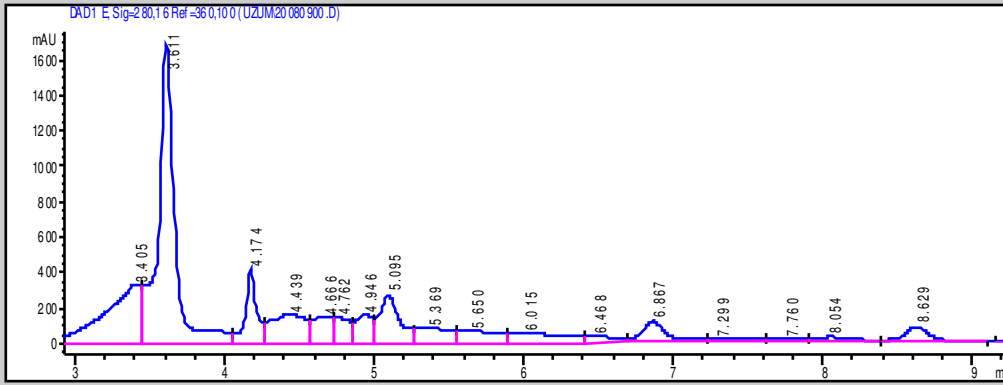
Üzüm Çekirdeği Kaynağı	Toplam Fenol İçeriği (mg Gallik Asit Eşdeğeri/g kurumadde)	FRAP Sonucu (mikromol Trolox Eşdeğeri/g kurumadde)
Pekmez Atığı	54.6 ± 6.4a	36.2 ± 5.5a
Şarap Atığı	27.9 ± 7.4b	20.0 ± 6.8b

Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Analiz ile Tayini

HPLC yöntemi ile standart kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 17). LÜÇÖ analizi ile elde edilen kromatogramlar (Şekil 18) değerlendirilerek içerikte yer alan gallik asit, kateşin ve epikateşin miktarları mg/100 gr toz madde olarak saptandı (Tablo 6).



Şekil 17: Epikateşin standardına ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 18: *Vitis vinifera* L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'ye ait kromatogram (3.6, gallik asit; 4.2, kateşin; 5.1, epikateşin)

Kromatografik analizler sonucunda toz haldeki ekstraktın gallik asit, kateşin ve epikateşin içerikleri Tablo 6'da özetlenmiştir.

H₂O₂ Konsantrasyonunun Krokin Çözeltisi Renginin Ağarması Üzerine Etkisi

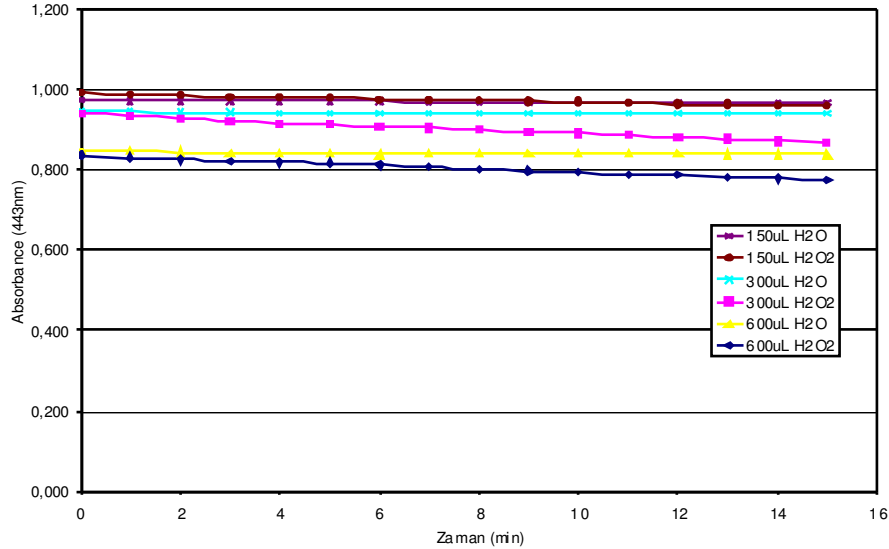
Şekil 18'de metanol içerisinde hazırlanan ve fosfat tamponu (pH 7) ile seyreltilen krokin çözeltisine su ve %30'luk hidrojen peroksit ilavesinin etkisi çizgi grafik olarak

görülmektedir. Spektrofotometre küvetinde toplam hacim 3mL olarak baz alınmış, belirtilen hacimler krokin çözeltisi ile toplam hacme tamamlanmıştır. Seyreltmenin etkisini görebilmek amacıyla hidrojen peroksit yerine saf su kullanılmıştır. Hidrojen peroksit güçlü bir oksidandır ve literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda bu konsantrasyondaki hidrojen peroksitin krokin

Tablo 6. *Vitis vinifera* L. cv. Çalkarası üzümünden elde edilen LÜÇÖ'nün gallik asit, kateşin ve epikateşin içerikleri (\pm standart sapma).

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

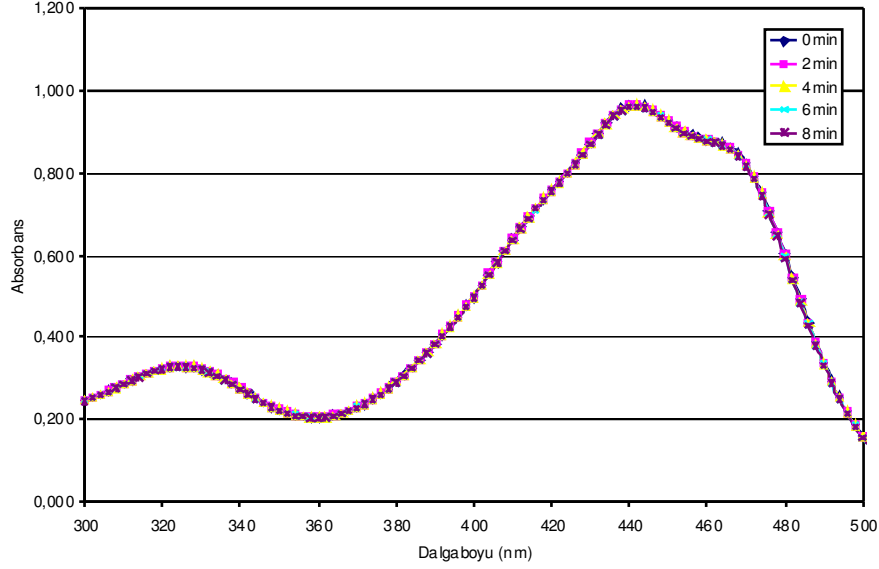
çözeltisinin rengini önemli derecede açması (ağarma) gerekiyordu. On beş dakikalık reaksiyon sonucunda 300 ve 600 μ L hidrojen peroksit ilavesi absorbans değerlerinde sırasıyla 0.06 ve 0.07'lik düşüş meydana getirdi (Şekil 19-21). Oysa literatürde, değerler bu düşüşlerin 10 katından fazla olarak rapor edilmiştir.



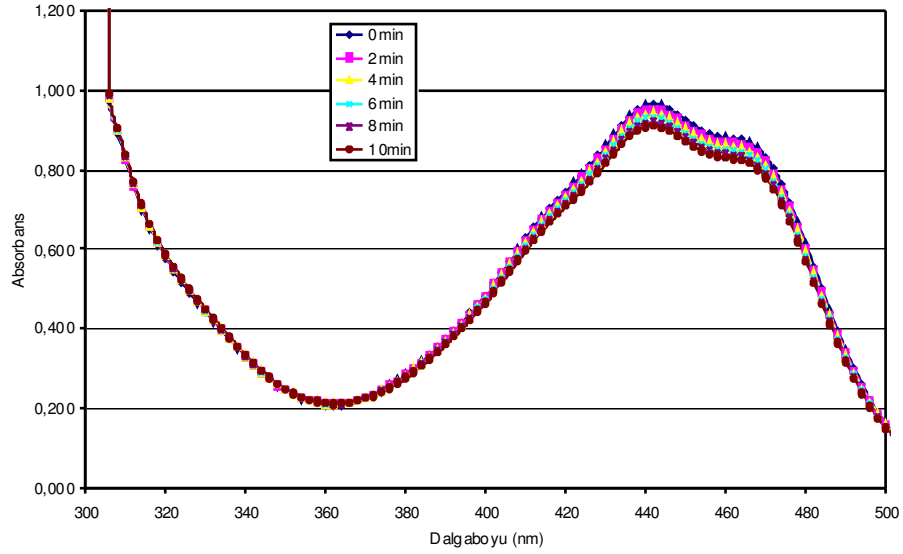
Şekil 19: Metanol içerisinde hazırlanan ve fosfat tamponu (pH 7) ile seyreltilen krokin çözeltisine su ve %30'luk hidrojen peroksit ilavesinin etkisinin çizgi grafikte gösterilmesi.

Saf su ilave edilmiş (150 μ L) krokin çözeltisinin 5 farklı zamanda elde edilmiş spektrumu Şekil 20'da görülmektedir. Ortamda oksidan olmadığı için spektrumda zamana bağlı herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Yüzde 30'luk hidrojen peroksit ilave edilmiş (150 μ L) krokin çözeltisinin altı farklı zamanda elde edilmiş spektrumu ise Şekil 21'de gösterilmiştir. 443nm dalgaboyunda absorbans değerinde düşme meydana gelmiş, ancak bu

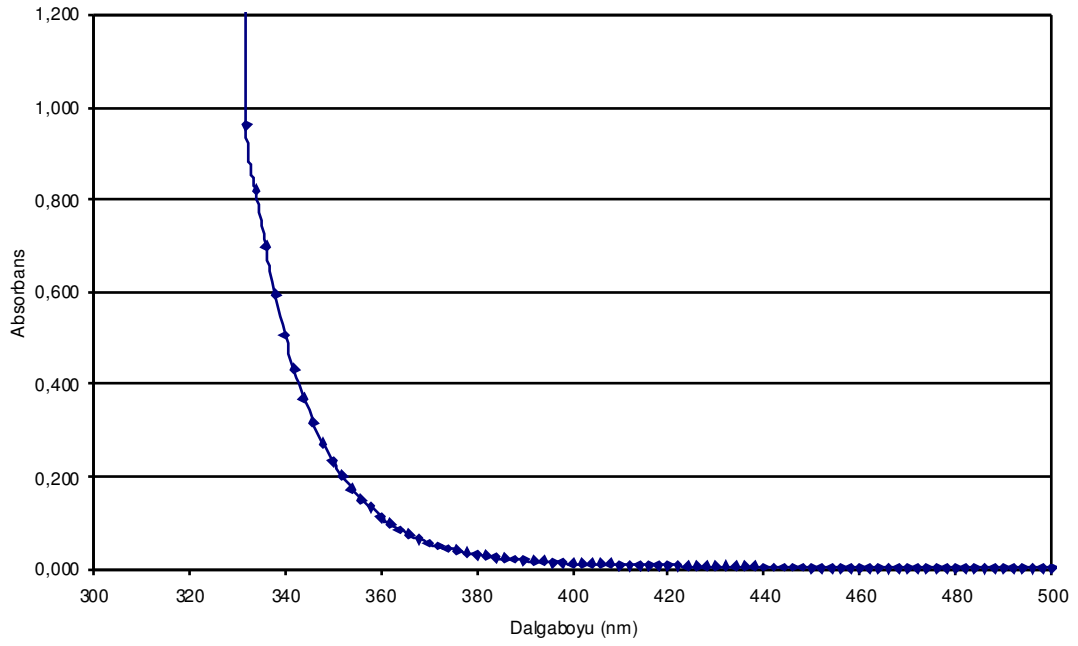
düşüş literatürde belirtildiği kadar şiddetli olmamıştır (Bkz. Tartışma, Şekil 44). 360 nm dalgaboyu öncesindeki yükselme hidrojen peroksitten kaynaklanan interferanstır. Hidrojen peroksitin spektrumu Şekil 22'deki grafikte gösterilmektedir.



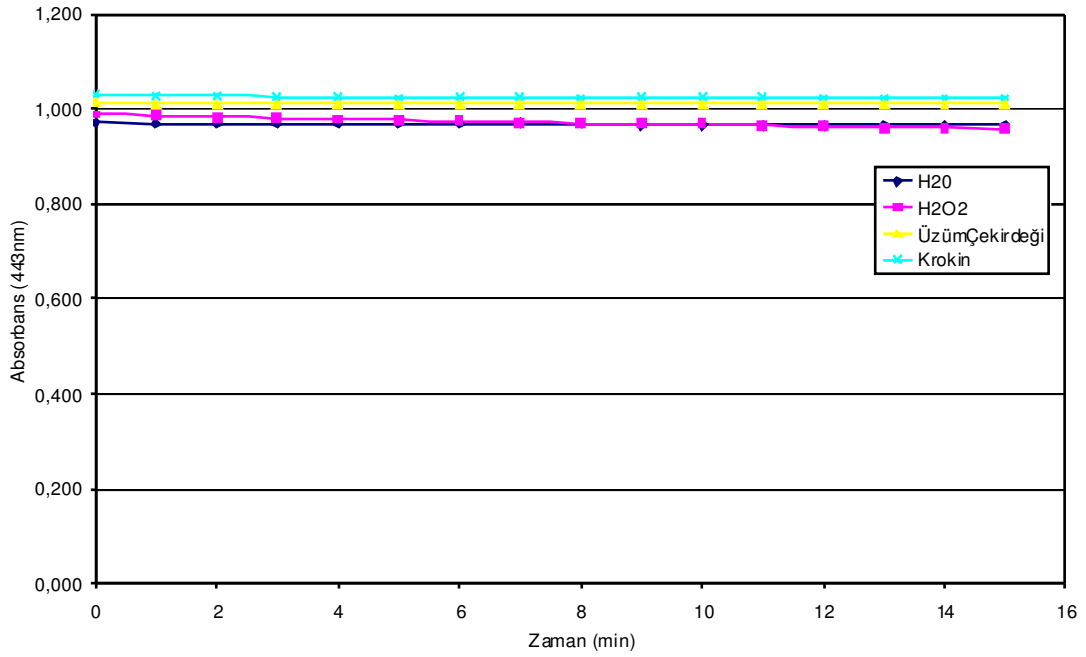
Şekil 20: Saf su ilave edilmiş (150µL) krokin çözeltisinin 5 farklı zamanda elde edilmiş spektrumu.



Şekil 21: Yüzde 30'luk hidrojen peroksit ilave edilmiş (150µL) krokin çözeltisinin 6 farklı zamanda elde edilmiş spektrumu.



Şekil 22: Hidrojen peroksitin spektrumu.



Şekil 23: Krokin çözeltisine ilave edilen 150µL su, hidrojen peroksit veya LÜÇÖ'nün absorbans üzerine etkisi. Krokin olarak isimlendirilen doğru saf krokin çözeltisinin 15 dakika boyunca absorbansını göstermektedir.

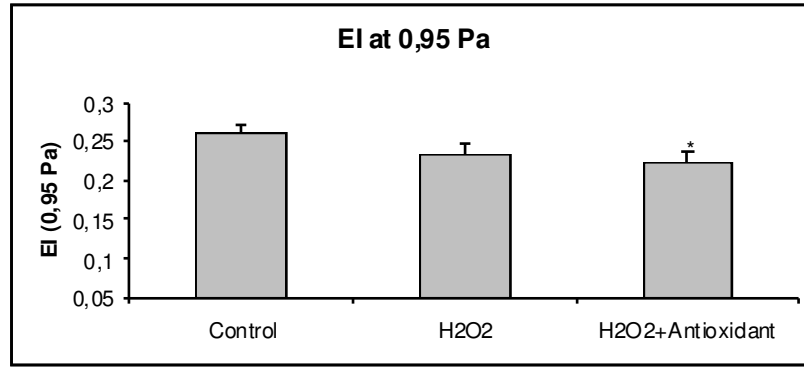
Şekil 23'deki grafikte ise krokin çözeltisine ilave edilen 150µL su, hidrojen peroksit veya LÜÇÖ absorbans üzerine etkisi görülmektedir. Krokin olarak isimlendirilen doğru saf

krokin çözeltilisinin 15 dakika boyunca absorbansını göstermektedir. Her iki maddeye karşı reaksiyonun gerçekleşmemesi nedeni ile deneyin başarısız olduğu sonucuna varıldı

LÜÇÖ'nün In Vitro ve In Vivo Antioksidan Etkinliği

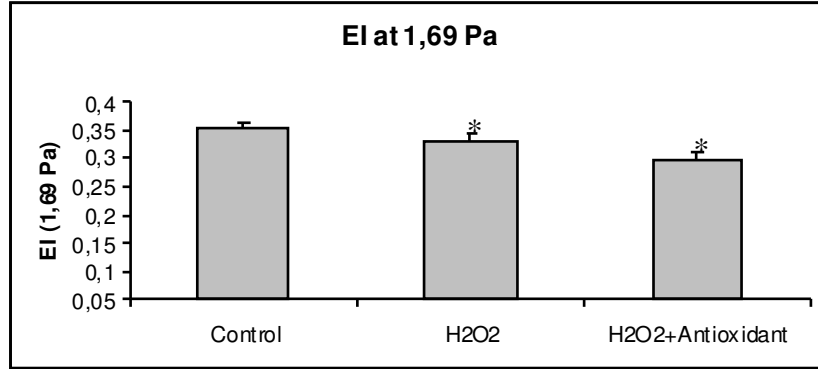
In vitro deney:

LÜÇÖ'nün vitro antioksidan özelliğinin incelenmesi sonucunda: İki ayrı kayma hızında (0,95 ve 1,69 Pa) H₂O₂ ile inkube edilmiş eritrositlerin deformabilitesi kontrole göre anlamlı ölçüde düşük bulundu (p<0.05), yani eritrositler üzerinde oksidan etki yaratılmış oldu. Antioksidan etki yaratmak için kullanılan LÜÇÖ (10mg/ml) 1 saatlik inkübasyon sonucunda in vitro olarak deformabiliteyi artırıcı yönde etkilemediği saptandı (Şekil 24, 25).



ortalama, standart hata, Test: Friedman+Wilcoxon ikili karşılaştırmalar için *: p<0,05 kontrolden fark

Şekil 24: 0,95 kayma hızında eritrosit deformabilitelerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği.



ortalama, standart hata, Test: Friedman+Wilcoxon ikili karşılaştırmalar için *: p<0,05 kontrolden fark

Şekil 25: 1,69 kayma hızında eritrosit deformabilitelerinin karşılaştırmalı çubuk grafiği. Kontrol grubuna göre diğer iki grubun ortalaması istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu. Hidrojen peroksit ile muamele edilen grup ile hidrojen peroksit + antioksidan (LÜÇÖ) uygulanan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

In vivo Deney:

İlk deneyde iki grup erişkin sıçana (n= 6, tedavi grubu ve kontrol grubu) yapılan bir dozluk (50mg/kg, ph:7.4) intraperitoneal LÜÇÖ uygulamasından sonra elde edilen bulgularda, plazmada kontrol grubuna göre tedavi grubunda daha yüksek TAS, daha düşük TOS ve OSİ bulundu (TAS için p=0,009; OSİ için p=0,026). Beyin dokusunda ise her iki grup arasında üç parametre sonuçlarının anlamlı fark göstermediği saptandı (Tablo7, 8).

Yedi Günlük LÜÇÖ Enjeksiyonu Sonucu Sıçan Beyin Dokusundaki TAS Tayini

İkinci deneyde de iki grup erişkin sıçan (n= 5, tedavi grubu ve kontrol grubu) kullanıldı. Tedavi grubuna yedi günlük intraperitoneal LÜÇÖ tedavisinin (50mg/kg/gün, ph:7.4) ardından beyin dokusunda yapılan inceleme sonucunda OSİ ortalaması 82.07, kontrol grubunda 50.85 olarak bulundu (Tablo 9). TAS ve TOS sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Yedi günlük LÜÇÖ tedavisinin beyin dokusunda TAS ve TOS düzeylerini değiştirmedeği gözlemlendi.

Tablo 7: LÜÇÖ'nün antioksidan etkinliğinin plazma ve beyin dokusunda gösterilmesine yönelik ilk deney sonuçları. Her bir sıçanda plazma ve beyin (hipokampus) dokusunda TAS, TOS değerleri ($OSİ=(TOS/TAS)*100$).

Gruplar	Sıçan			Plazma		Beyin			
	No	TAS	TOS	OSİ	ort±SD	TAS	TOS	OSİ	ort±SD
Kontrol grubu	1	2,13	40,23	1888,7	1309,8 ±484,7	4,72	57,73	1223,1	3223,5 ±1361,0
	2	2,15	30,17	1403,3		2,33	91,80	3939,9	
	3	2,03	25,60	1261,1		3,31	86,69	2619,0	
	4	2,02	8,57	424,3		2,79	85,26	3055,9	
	5	1,51	20,69	1370,2		3,42	109,22	3193,6	
	6	1,83	27,66	1511,5		1,51	80,18	5309,9	
Tedavi grubu	1	2,65	19,71	743,8	486,5 ±229,0	3,99	91,59	2295,5	3471,2 ±834,9
	2	2,57	6,23	242,4		2,76	78,75	2853,3	
	3	2,45	10,46	426,9		2,50	82,01	3280,4	
	4	2,10	12,51	595,7		2,41	92,24	3827,4	
	5	2,46	17,20	699,2		1,97	91,14	4626,4	
	6	2,30	4,86	211,3		2,24	88,36	3944,6	
p (T-Test)					0,007				0,71

ÖĞRENME TESTLERİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

Morris Su Tankı Testi (Water Maze) Bulguları

Zaman açısından (escape latency) 1.Grup (HİE+LÜÇÖ) ile 2.Grup (LÜÇÖ) ve 3.Grup (kontrol grubu) arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 10, Şekil 26). Yol

açısından (path length) ise sadece 1. ve 2. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü ANOVA, Post Hoc Tukey).

Tablo 8: Grupların plazma ve beyin dokusunda TAS, TOS değerleri, karşılaştırma sonuçları.

	GRUP	N	Ortalama	Std.D.	P (T-Test)
BEYİN-TAS mmolTrolox Equiv./L/mg	kontrol	6	3,01	1,06	0,50
	tedavi	6	2,64	0,7	
BEYİN-TOS $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L/mg	kontrol	6	85,15	16,2	0,77
	tedavi	6	87,35	5,6	
Plazma-TAS mmolTrolox Equiv./L	kontrol	6	1,94	0,2	0,004
	tedavi	6	2,42	0,2	
Plazma-TOS $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	kontrol	6	25,49	10,5	0,025
	tedavi	6	11,83	5,9	

Tablo 9: Yedi günlük intraperitoneal LÜÇÖ enjeksiyonu sonrası beyin (hipokampus) dokusunda TAS, TOS değeri ortalamaları ve karşılaştırma sonuçları. Gruplar arasında ortalamalar arası farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Gruplar	Siçan No	Beyin TOS [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L/mg]	Beyin TAS [mmolTrolox Equiv./L/mg]	Oksidatif stres indeksi [OSI=(TOS/TAS)*100]
Kontrol	1	2,11	5,86	36,01
	2	1,92	14,64	13,12
	3	8,21	9,46	86,88
	4	3,89	8,73	44,60
	5	5,47	7,42	73,64
		4,32 \pm 2,61*	9,22 \pm 3,32*	50,85 \pm 29,57*
Tedavi	1	1,85	9,47	19,48
	2	5,81	7,42	78,30
	3	11,56	7,91	146,22
	4	6,34	6,03	105,20
	5	8,43	13,78	61,14
		6,80 \pm 3,57*	8,92 \pm 2,98*	82,07 \pm 47,43*
P**		0,25	0,91	0,2

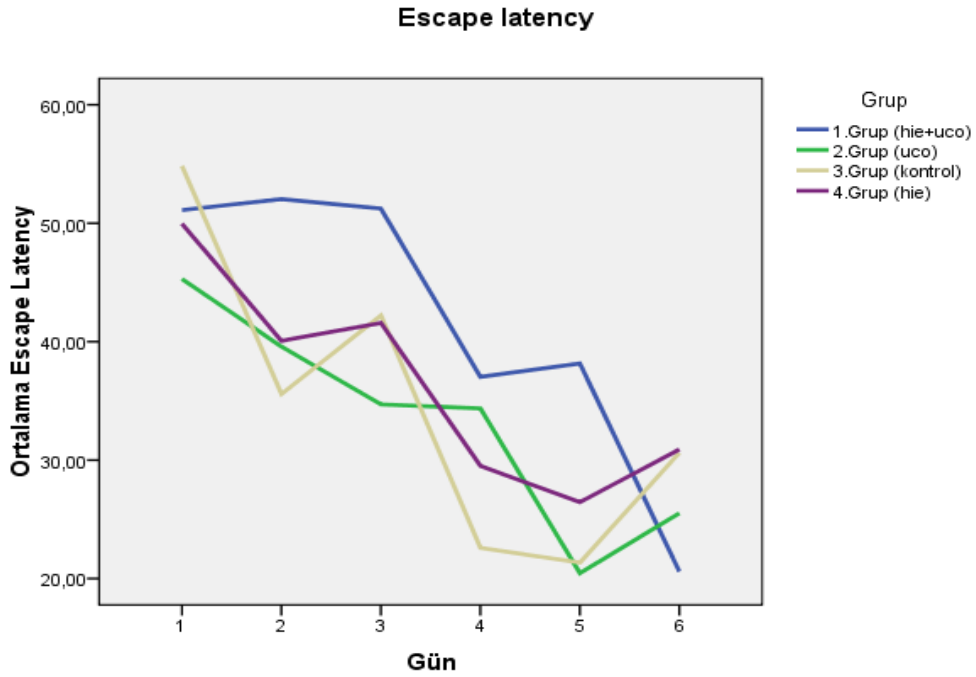
(*Ort \pm SD, **T-Test).

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

Zaman açısından oluşturulan çizgi grafikte (Şekil 26) Birinci grubun (HİE+LÜÇÖ) en kötü performansı gösterdiği görülmektedir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 10). Birinci gün *pretraining* safhası olduğundan istatistik işlemlerine alınmamıştır. Ancak diğer günlerde kontrol grubu da dâhil olmak üzere performansın değişmeler gösterdiği açıktır.

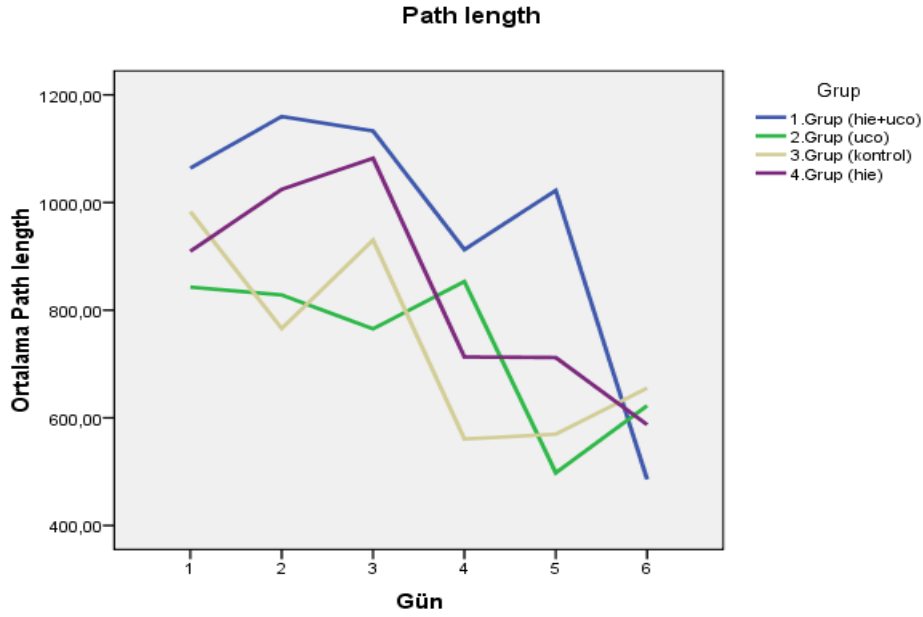
Tablo 10: Morris su tankı testi (Morris Water Maze) sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri tablosu. (tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü ANOVA, Post Hoc Tukey testi).

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



Şekil 26: Sıçanın platforma ulaşması için geçen zaman açısından (Escape Latency, saniye) grupların karşılaştırılması. Birinci grubun (HİE+LÜÇÖ) en kötü performansı gösterdiği görülmektedir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu, p değerleri Tablo 10’da verilmiştir.

Yol uzunluğu karşılaştırması ile ilgili çizgi grafikte (Şekil 27), zaman ile uyumlu olacak şekilde 1.Grubun en kötü performansa sahip olduğu görülmektedir. 2.Grup ile 3.Grubun, 1.Grup ile 4.Grubun benzer grafiklere sahip olduğu görülmektedir. Ancak 4.Gruba göre 1.Grubun daha kötü performansa sahip olması HİE’nin yanı sıra verilen LÜÇÖ’nün tabloyu ağırlaştırdığı anlamı çıkarılabilir.



Şekil 27: 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 etikleri görülmektedir. Bu karşılaştırmada da 1. ve 2. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Bkz Tablo 10).

Sekiz Kollu Labirent Testi (Radial Eight Arm Maze) Bulguları

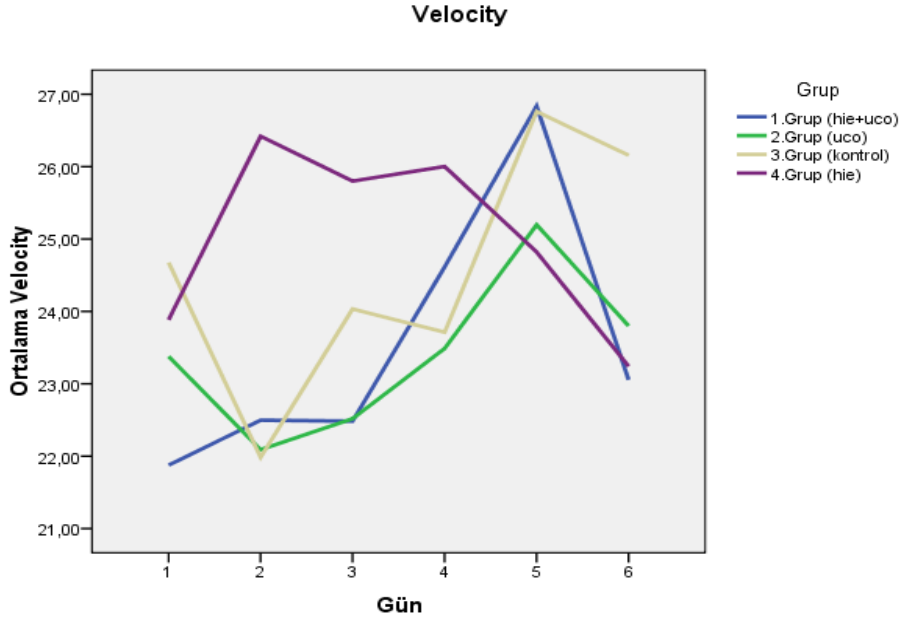
Değerlendirme dört parametre açısından yapıldı: Doğru sayısı, kol hatası, toplam hata ve süre. Ortalamalar arası farkın karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü ANOVA, Post-Hoc Tukey testleri kullanıldı.

Elde edilen sonuçlara göre HİE uygulanan sıçanların performansı dört parametre açısından (doğru sayısı, kol hatası, toplam hata ve zaman) diğer gruplara göre daha kötü bulundu. Doğru sayısı bakımından 3 ile 4. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. 3. grup ile 1 ve 2. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 29). Yani üzüm çekirdeği özütü enjeksiyonu HİE oluşturulan hayvanlarda davranış boyutunda anlamlı bir iyileşme sağlamamıştır.

Kol hatası ortalamaları açısından 4. grup en fazla hata yapan grup olarak görüldü. Bu grup ile 3. grup arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı idi (Şekil 30).

Toplam hata ortalamalarına bakıldığında 3. grup ile 4. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 31).

Testi tamamlama sürelerinin ortalamaları açısından kontrol grubu (3. grup) en kısa süreye sahip olsa da aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

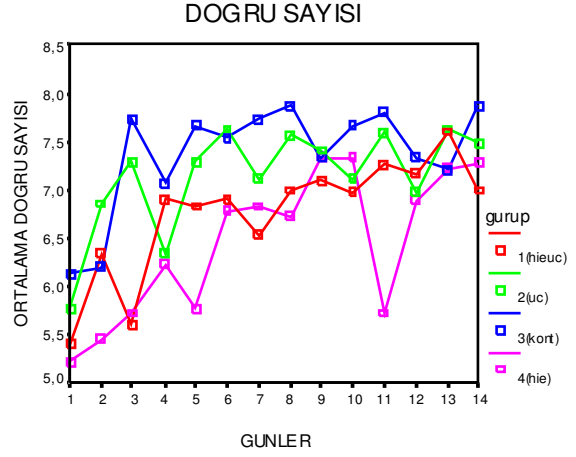
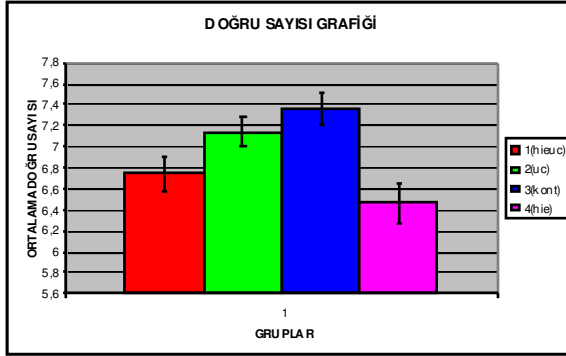


Şekil 28: Ortalama hız (Velocity, cm/sn) açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo.10). Bu durum test edilen sıçanlarda motor yetersizlikten kaynaklanan bir fark olmadığını kanıtladığı için testin güvenilirliğini artırmaktadır.

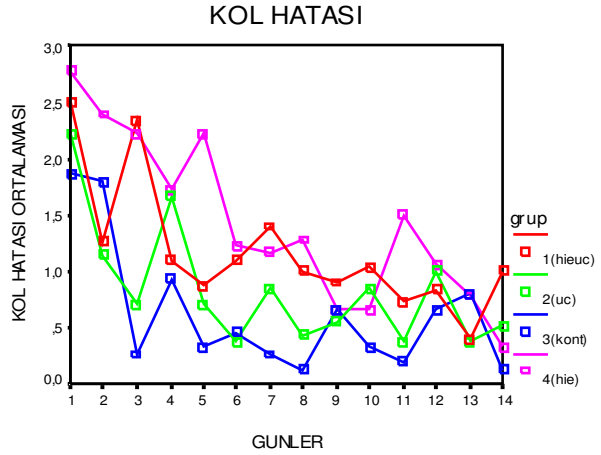
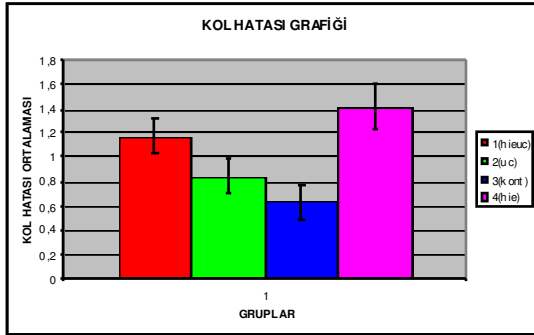
Sonuç olarak LÜÇÖ enjeksiyonu, HİE oluşturulan hayvanlarda davranış boyutunda istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlanamıştır.

Tablo 11: Davranış testi verilerinin ortalama, standart hata olarak gruplara dağılımı.

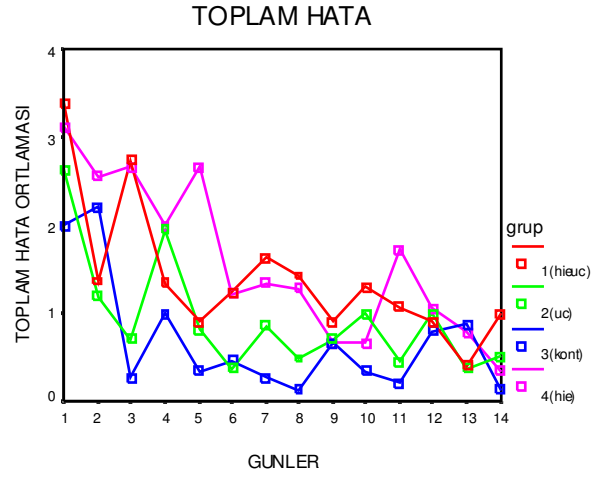
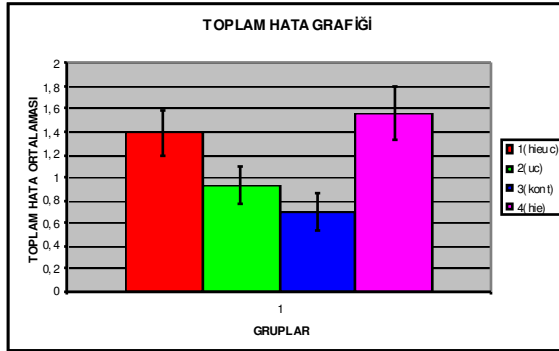
Gruplar	1	2	3	4
Doğru Sayısı	6,75±0,16	7,14±0,14	7,36±0,15	6,46±0,2
Kol Hatası	1,17±0,15	0,84±0,14	0,63±0,15	1,42±0,19
Toplam Hata	1,39±0,2	0,93±0,17	0,69±0,17	1,57±0,23
Süre (sn)	102,83±10,63	88,61±5,26	70,66±5,53	120,73±12,51



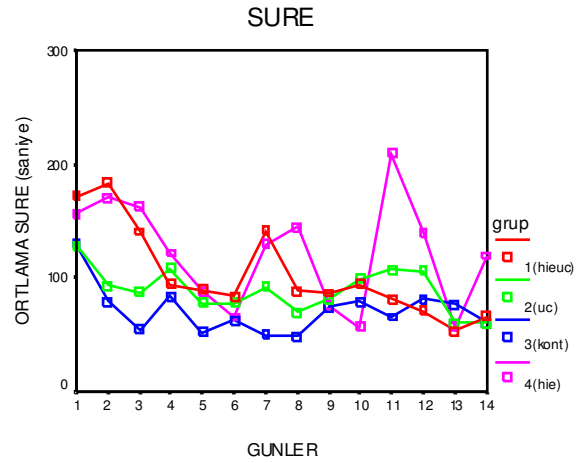
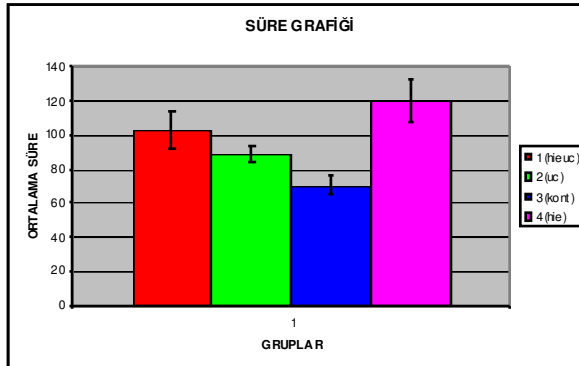
Şekil 29: Doğru sayısı ortalamalarının çubuk ve çizgi grafiği. Üçüncü (Kontrol grubu) grup ile 4. (HİE) grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.04$). HİE grubunun doğru sayısı anlamlı derecede azalmıştır. Kontrol grubu ile 1. ve 2. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 30: Kol hatası ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafikleri. Kontrol grubu ile HİE oluşturulan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.007$). Diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 31: Toplam hata ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafiği. Kontrol grubu ile HİE oluşturulan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.02$).



Şekil 32: Testi tamamlama sürelerinin ortalamalarını gösteren çubuk ve çizgi grafikleri. Burada gruplar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

BEYİN AĞIRLIĞI AÇISINDAN GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Dekapitasyon ile sonlandırılan deney süreci sonunda sıçanların vücut ve beyin ağırlıkları bakımından gruplar arasında farklılıklar olduğu görüldü (Tablo 12, Şekil 33). Birinci grupta (HİE+LÜÇÖ uygulanan grup) olanların diğer gruplara göre en az vücut ağırlığı

ve beyin ağırlığı ortalamasına sahip oldukları, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Tablo 12, Şekil 33).

En yüksek vücut ağırlığı ve beyin ağırlığı ortalamasının 3. gruba (sağlam kontrol) ait olması deneyin güvenilirliği açısından olumlu bir bulgu olarak değerlendirildi.

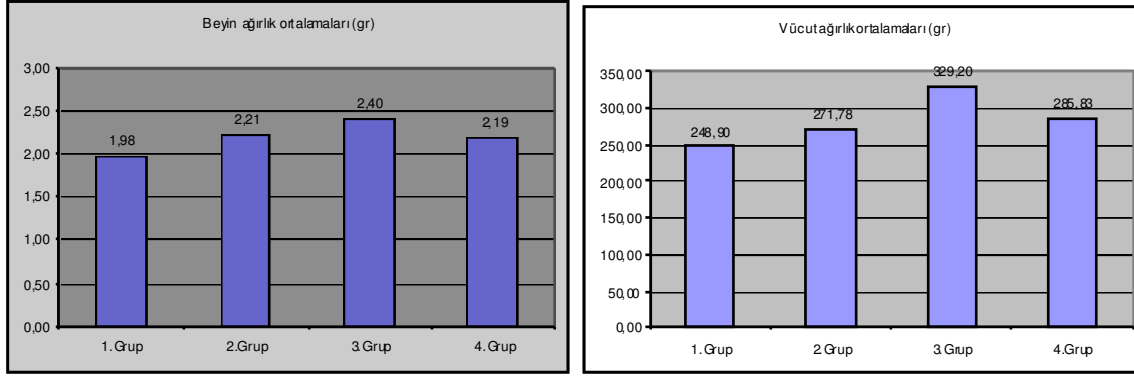
Beyin ağırlığı ortalaması bakımından 3. Gruba göre tüm grupların beyin ağırlıkları daha az bulundu. Bu fark sadece 3 ile 1. Grup arasındaki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$). 1. Grubun diğer üç gruba göre farkı ise istatistiksel olarak anlamlı idi (bkz. Tablo 1). Makroskopik incelemede de özellikle 1. Grupta yer alan sıçanların biri hafif, dördü ağır olmak üzere beşinde beyin dokusu kaybı olduğu saptandı (Şekil 34).

Vücut ağırlığı bakımından 3. grubun en yüksek ortalamaya sahip olduğu, diğer tüm gruplarla olan farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Birinci ile 2. Grup, 2. ile 4. Grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, 1. Grup ile 4. Grup arasındaki farkın ise anlamlı olduğu görüldü (Tablo 12).

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 azlık 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 enjeksiyonunun ayrı ayrı bu olgulara katkıda bulunduğu, ancak her ikisinin bir arada uygulanmasının olayı daha da artırdığı izlenimine varıldı.

Tablo 12: Gruplara ait beyin ve vücut ağırlık ortalamaları. Tek yönlü ANOVA testi ile gruplar arası ortalamaların farklılığı test edildi. Post Hoc test olarak Bonferroni kullanıldı. P değerleri gruplar arası karşılaştırmayı gösterecek şekilde verilmiştir (1-2, 3: birinci ile ikinci ve üçüncü grubun karşılaştırılması gibi).

<i>Gruplar</i>	<i>Beyin ağırlık ortalamaları (gr)</i>	<i>SE</i>	<i>SD</i>	<i>Grup-grup: P değeri</i>	<i>Vücut ağırlık ortalamaları (gr)</i>	<i>SE</i>	<i>SD</i>	<i>Grup-grup: P değeri</i>
1.	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.	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.	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 4-1: 0,010
4.	2,19 (2,06-2,30)	0,04	0,09	3-2,4: 0,1 2-4: 1	285,83 (260-321)	8,57	20,99	4-2: 1



Şekil 33: 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= 0,000, 3-4 gruplar arası=0,010, 1-2 gruplar 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, 1-2 gruplar arası = 1, 4-1 gruplar arası =0,010, 4-2 gruplar arası=1)

SAĞ HİPOCAMPUS CA3-2 ALANLARINDAKİ TOPLAM PYRAMİDAL HÜCRE SAYILARI

Elde edilen bulgulara göre sağ hipokampus CA3-2 tabakalarındaki toplam piramidal nöron sayısı ortalamalarına göre kontrol grubu (3. Grup) en yüksek piramidal hücre sayısına sahipken (703020), en düşük hücre sayısı tedavi edilmemiş HİE uygulanan (4.Grup) sıçanlarda bulundu (578250). LÜÇÖ verilen normal sıçanlarda (2.Grup) kontrol grubuna göre hücre sayısının az olduğu (628312), HİE +LÜÇÖ verilen 1.Grupta ise tedavi edilmemiş HİE grubuna (4.Grup) göre daha fazla olduğu görüldü (595125) (Tablo 13, Şekil 36). Ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Ancak daha önce yapılan öğrenme-bellek testleri ile bu dönemde hesaplanan toplam piramidal hücre sayılarının ortalamaları arasında paralellik olması dikkat çekici bulundu.



A



B



C



D

Şekil 34: Beyinlerdeki makrosopik değişiklikler ile ilgili resimler: A: Üçüncü gruba ait normal beyin, B,C,D: Birinci gruba ait sıçanlardan birinde görülen hafif doku kaybı.



A

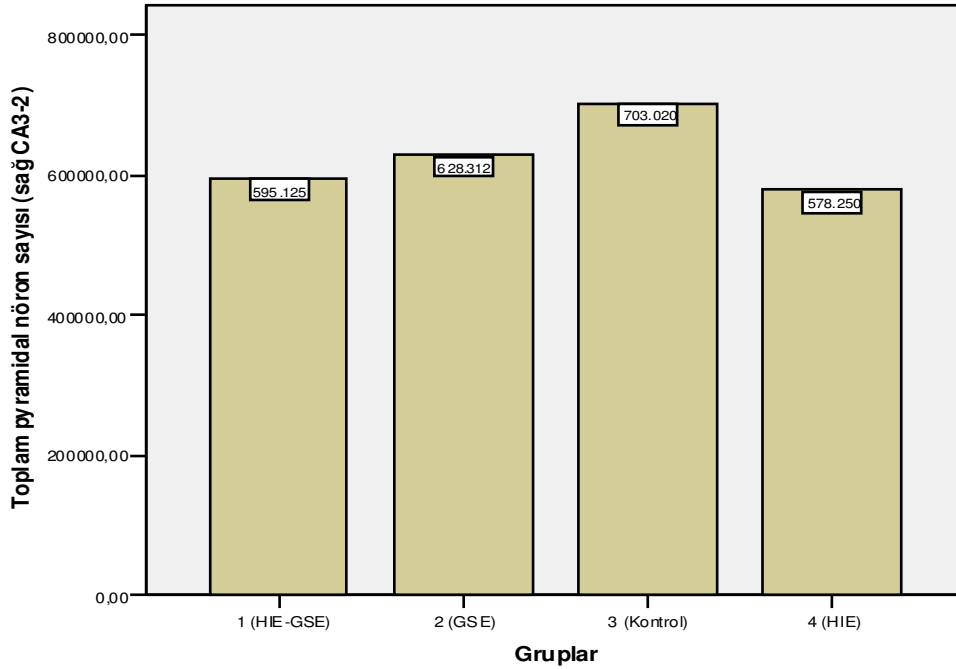


B

Şekil 35: Birinci gruba ait bir sıçanda görülen yoğun doku kaybı ve kistleşme. A: Soldan görünüm. B: Üstten görünüm.

Tablo 13: Gruplara ait sağ hipokampus CA3-2 alanlarındaki toplam pyramidal nöron sayısı ortalamalarını gösterir tablo. 1.Grup: HİE-LÜÇÖ uygulanmış grup, 2.Grup: Herhangi girişim yapılmadan LÜÇÖ verilmiş grup, 3.Grup: Normal kontrol grubu, 4.Grup: HİE uygulanmış grup. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

GRUP	ORTALAMA	Standart hata
1	595125	56479,35
2	628312,5	89863,04
3	703020	55428,25
4	578250	36442,59



Şekil 36: Gruplara ait sağ hipokampus CA3-2 alanlarındaki toplam pyramidal nöron sayısı ortalamalarını gösterir çubuk grafik. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

LÜÇÖ enjeksiyonu, HİE oluşturulan hayvanlarda sağ hipokampus CA3-2 tabakasındaki pyramidal nöron sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır.

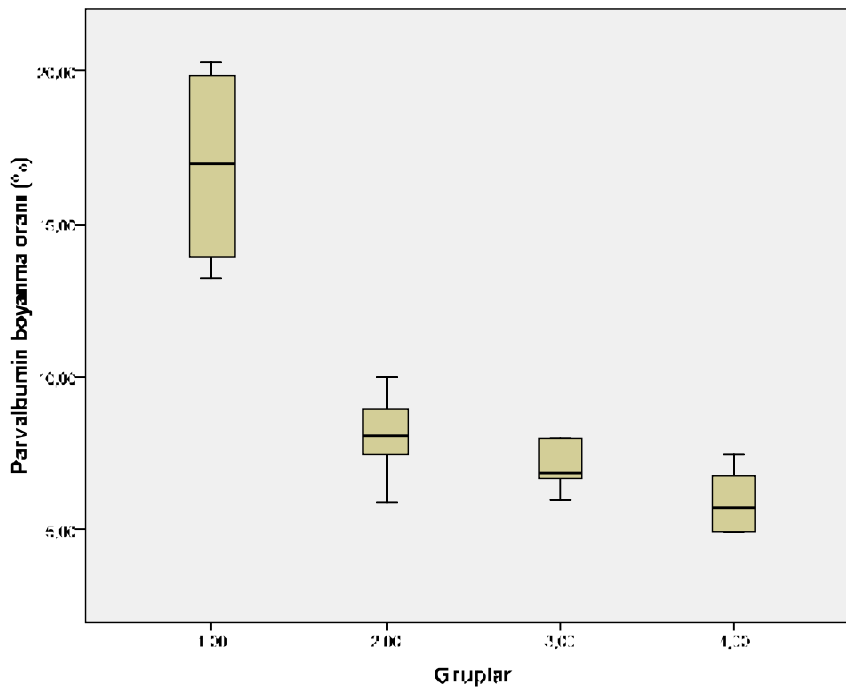
İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE BOYALI KESİTLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elde edilen sonuçlara göre 1.Grup en fazla PV + hücre oranına sahip bulundu. Gruplar arasındaki fark 1.grup açısından istatistiksel olarak anlamlı bulundu (14. Tablo, 37. Şekil).

Tablo 14: Hipokampus CA3-2 alanlarında parvalbumin + piramidal hücre oranını (%) gösteren tablo. Parvalbumin + hücrelerin oranı açısından grupların karşılaştırılmasında 1. grup ile diğer üç grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. Her üç grup için P=0.000).

Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Minimum	Maksimum
1	16,88*	3,47	1,74	13,25	20,30
2	8,08	1,38	0,56	5,92	10,00
3	7,09	0,89	0,39	6,00	8,00
4	5,93	1,05	0,43	4,91	7,50

*p=0,000 diğer üç grupla olan fark



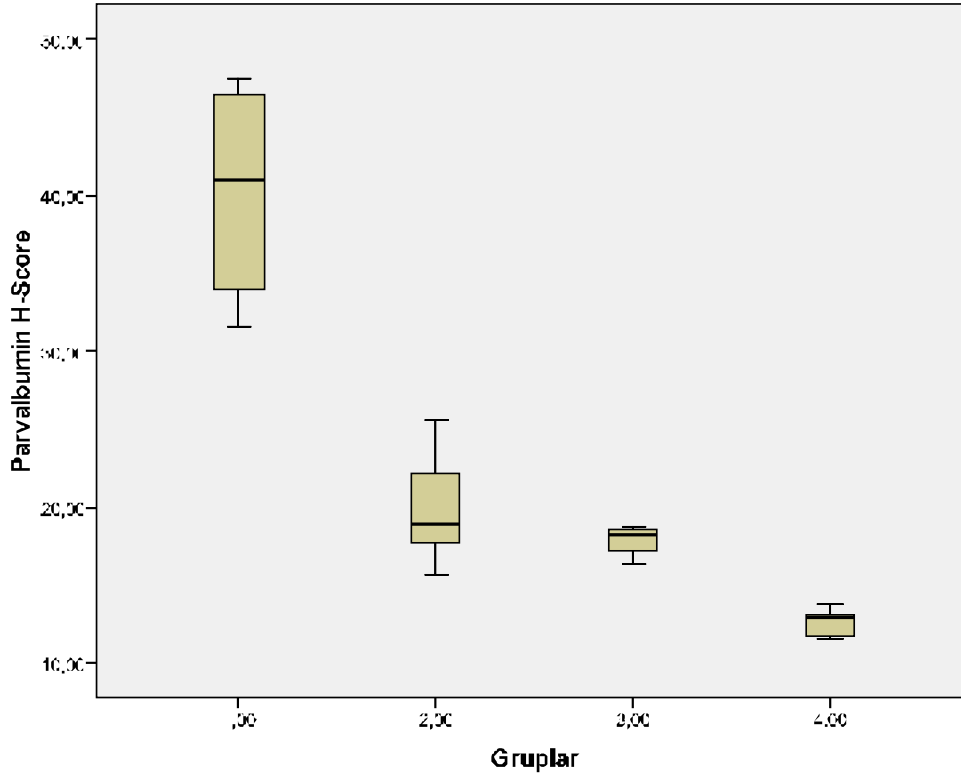
Şekil 37: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında parvalbumin + piramidal hücre oranı ortalamalarının grafiği. 1. grup ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Diğer üç grup için p=000).

Dört gruba ait hipokampus CA3-2 bölgelerindeki parvalbumin + piramidal hücreler açısından H-Score ortalama değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında en yüksek değer 1. gruba ait olduğu görüldü. Diğer gruplara göre iki kat ve daha fazla boyanma yoğunluğu

gösteren bu grubun farkı istatistiksel olarak diğer her üç grup açısından anlamlı bulundu (ANOVA, Post Hoc Bonferroni test. Her üç grup için $p=0,000$). Aşağıda Tablo 15 ve Şekil 38’de bulgularla ilgili ayrıntılı bilgi bulunmaktadır.

Tablo 15: Hipokampus CA3-2 bölgelerindeki parvalbumin + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından hesaplanan H-SCORE değerlerini gösteren tablo. H-Score karşılaştırmasında 1. grup ile diğer üç grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. Her üç grup için $p=0,000$).

Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Minimum	Maksimum
1	40,19	7,57	3,79	31,50	47,47
2	19,80	3,55	1,45	15,64	25,60
3	17,61	3,91	1,75	12,00	22,75
4	13,51	2,43	0,99	11,60	18,17



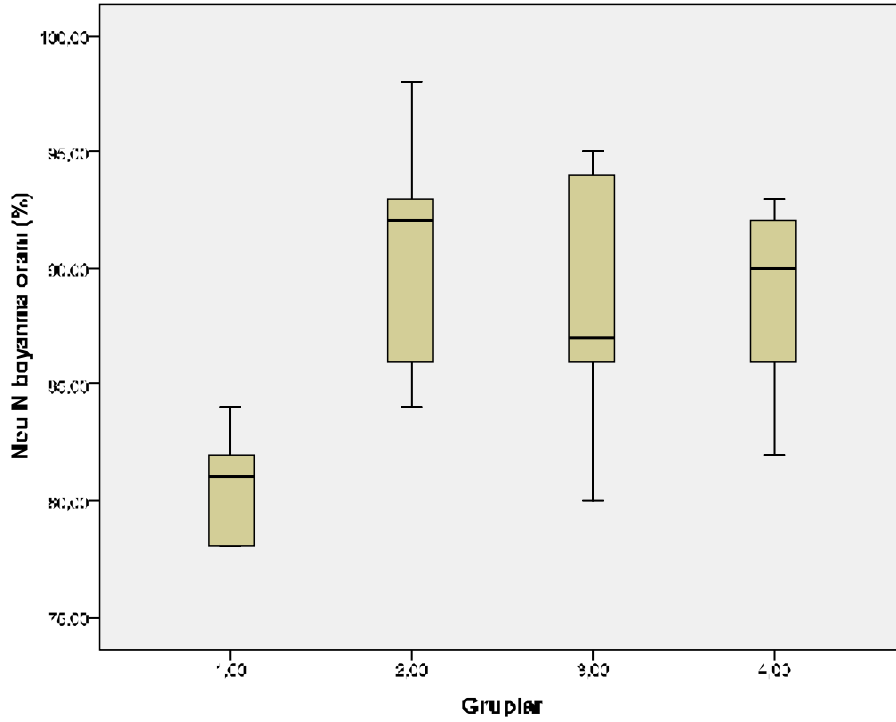
Şekil 38: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında parvalbumin + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından hesaplanan H-SCORE açısından grupların karşılaştırılmasında 1. grubun diğer gruplardan daha yoğun boyanma gösterdiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0,000$).

NeuN + piramidal hücreler açısından hipokampus CA3-2 alanlarının incelenmesinde ise en yüksek oranda NeuN + hücrenin 2. grupta, en az oranda boyanmanın ise 1. grupta olduğu görüldü. H-Score karşılaştırmasında yine 1. grup en düşük değere sahip iken en yüksek değer 3. gruba aitti. İstatistiksel açıdan immunpozitif hücre oranı farkının 1. grup ile 2. grup ve 3. grup arasında anlamlı olduğu görüldü. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. 2. grup için $P=0.016$, 3. grup için $p=0,008$). Dördüncü grup ile 1. grup arasındaki fark açısından p değerinin sınırda olması da dikkate değer bulundu ($p=0,057$).

H-Score açısından gruplar arasındaki fark 1. grup ile 3. grup arasında anlamlı bulunurken ($p=0,008$), diğer gruplar açısından anlamlı değildi. On altıncı ve 17. tablo ile 39. ve 40. şekillerde konu ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir.

Tablo 16: Hipokampus CA3-2 alanlarında NeuN+ piramidal hücre oranını (%) gösteren tablo. NeuN + hücrelerin oranı açısından grupların karşılaştırılmasında 1. grup ile 2. grup ve 3. grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. 2. grup için $P=0.016$, 3. grup için $p=0,008$).

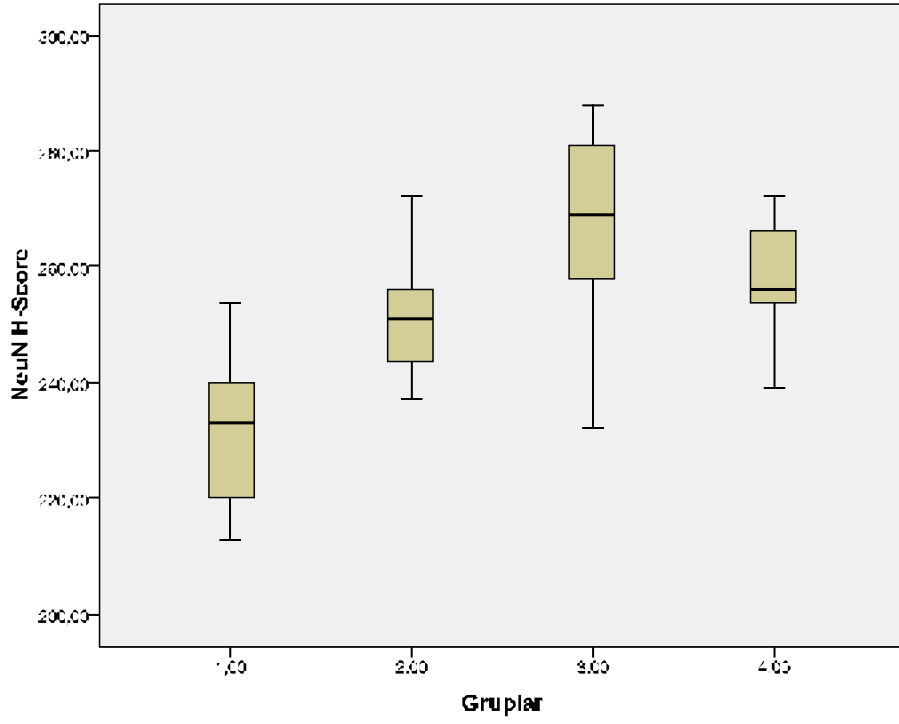
Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Minimum	Maksimum
1,00	80,6667	2,42212	,98883	78,00	84,00
2,00	90,6667	4,69042	1,56347	84,00	98,00
3,00	88,4000	6,18870	2,76767	80,00	95,00
4,00	88,6000	4,56070	2,03961	82,00	93,00



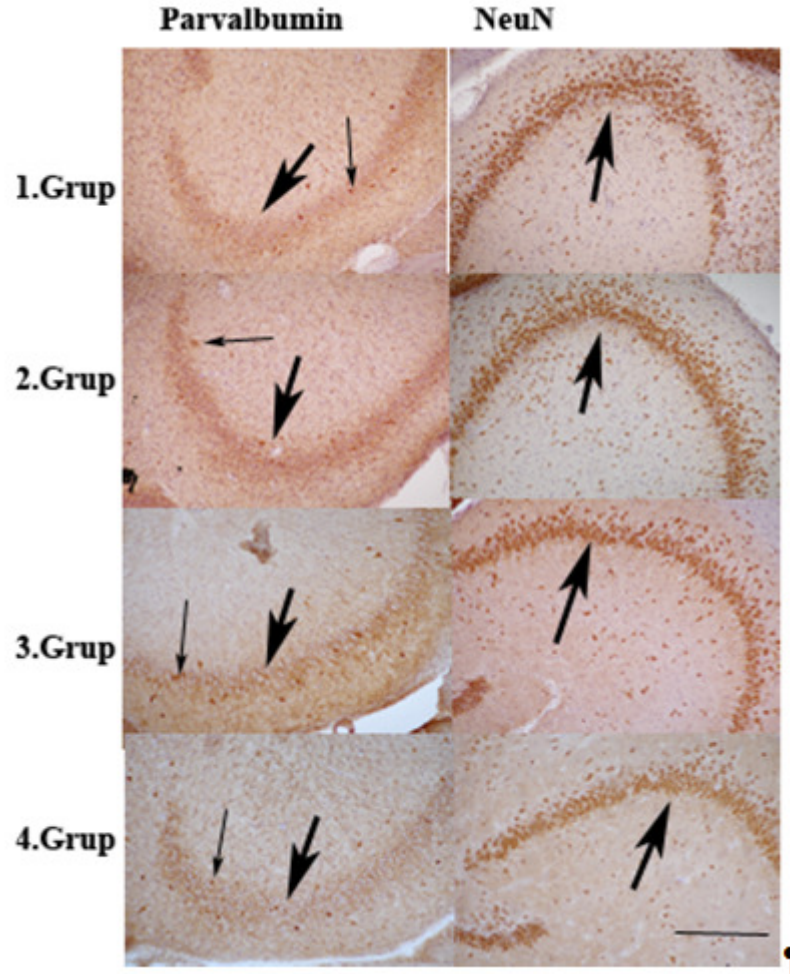
Şekil 39: Hipokampus CA3-2 alt bölgelerinde, piramidal hücre tabakasında NeuN + piramidal hücre oranı ortalamalarının grafiği. 1. grup ile 2. grup ve 3. grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. 2. grup için P=0.016, 3. grup için p=0,008).

Tablo 17: Hipokampus CA3-2 bölgelerindeki NeuN + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından hesaplanan H-Score değerlerini gösteren tablo. Boyanma yoğunluğu açısından H-Score karşılaştırmasında fark 1. grup ile 3. grup arasında fark anlamlı bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. P=0.008)

Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Minimum	Maksimum
1,00	232,17	14,54	5,94	213,00	254,00
2,00	251,25	10,79	3,82	237,00	272,00
3,00	265,60	22,01	9,84	232,00	288,00
4,00	257,40	12,64	5,65	239,00	272,00



Şekil 40: NeuN + piramidal hücrelerin boyanma yoğunluğu açısından H-Score karşılaştırmasında 1. grup ile 3.grup arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. (Tek yönlü ANOVA testi, Post Hoc Bonferroni Testi. P=0.008).

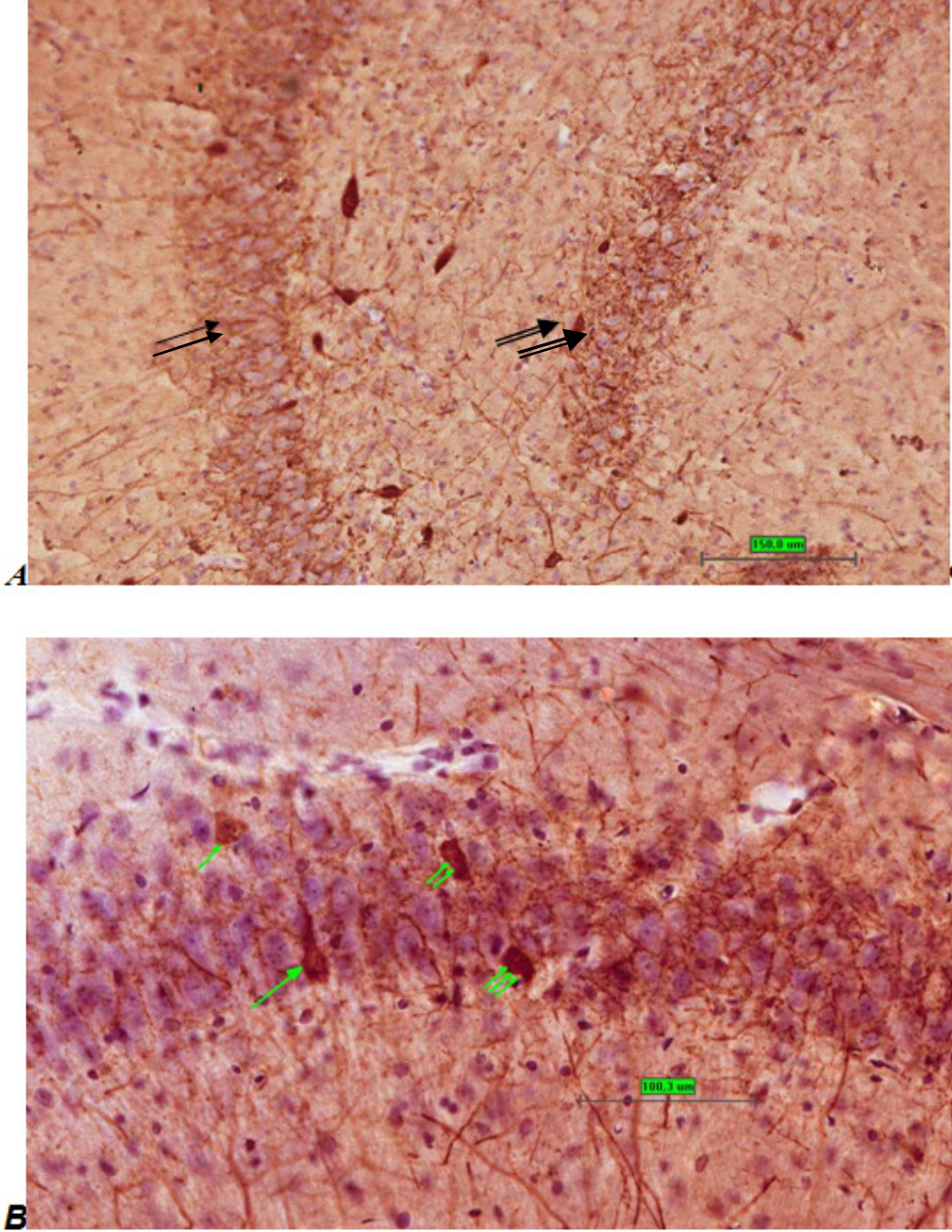


Şekil 41: Hipokampus CA3-2 alanlarına ait 10X büyütmede mikroskop görüntüleri (kılavuz çizgi 150 µm). Sol sütunda yer alan görüntüler parvalbumin, sağ sütunda yer alan görüntüler ise NeuN immün pozitif boyanmayı göstermektedir. Kalın oklar piramidal hücre tabakasının sınırını işaret etmektedir. İnce oklar parvalbumin pozitif hücre örneklerini göstermektedir. NeuN pozitif hücre oranının oldukça fazla olduğu, parvalbumin pozitif hücre oranının az olduğu görülüyor.

Yukarıda görülen Şekil 41, parvalbumin ve NeuN pozitif hücrelerin pyramidal nöron tabakası içinde dağılımını göstermektedir. Skorlama yapılmadan yapılan değerlendirmede elde edilen sonucun yanıltıcı olabileceği de açıktır. Yine Şekil 42’de skorlamada boyanmanın şiddetinin değerlendirilmesi açısından yapılan ayırım gösterilmiştir.

Calretinin açısından yapılan immunohistokimya uygulamasında elde edilen boyanmış kesitlerin değerlendirilmesinde, literatürde bildirilen boyanma örneklerinden çok daha yoğun bir boyanma gözlemlendi. Bu sonucun normal olamayacağı düşünülerek bu konuda deneyimli laboratuvarlarla görüşüldü. Projeye destek veren Prof. George Paxinos (Neuroscience

Research Australia, Sydney) yapılan birebir görüşmede preparatlerimizdeki boyanmalar yalancı pozitif boyanma olarak değerlendirildi. Bu nedenle calretinin boyalı preparatlar değerlendirmeye alınmadı.



Şekil 42. A: Parvalbumin sentezi açısından immunohistokimyasal olarak boyanmış hipokampus horizontal kesitinde gyrus dentatus granüler hücre tabakası (tek ok) ve CA3 pyramidal hücre tabakası (çift ok) görülmekte. B: Parvalbumin pozitifliği açısından skorlamada kullanılan 1-2-3 skorlamasında hafif yoğunluklu boyanmış hücre küçük tek ok, orta yoğunluklu boyanmış hücreler büyük tek ok ve çift ok, çok yoğun boyanmış hücre üç ok ile gösterilmiştir. Parvalbumin negatif hücreler ise açık mor olarak görülmektedir.

TARTIŞMA

Antioksidan gıdaların laboratuvar ortamında araştırılması uzun bir süre gıda ve kimya ile ilgili bilim insanlarını meşgul etmiştir. İnternette “Google® Akademik” tarama motoru ile “grape seed” olarak yapılan bilimsel makale taramasında 1990 yılına kadar yayınlanmış 238 makalenin yaklaşık tamamı gıda ve kimya dergilerinde yayınlanmıştır. Ancak 1990 ile 2000 yılları arasında hem bu konudaki makalede (913 makale) hem de sağlık bilimleri ile ilgili dergilerde artma göze çarpmaktadır. İki bin yılından günümüze kadar ise on dört bin civarında yayınlanmış makale bulunmaktadır. Bu artış doğal antioksidanlar üzerindeki ilgin giderek arttığının da kanıtıdır. Üzüm çekirdeğinden izole edilen maddelerin ticari sunumunun yanı sıra doğrudan üzüm çekirdeğinin öğütülmesi veya ekstraksiyonu ile elde edilen ürünler de pazarlanmaktadır. Ancak gerek doğrudan tüketilen üzüm çekirdeği, gerek ise üzüm çekirdeğinden izole edilen maddelerin güvenilirliği ve etkinliği araştırma konusu olmaya devam etmektedir (YAMAKOSHI, 2002). Bunun nedeni deney tüpünde gerçekleşen reaksiyonların tam benzerinin doğal ortamda, yani organizmanın iç şartları altında oluşmamasıdır. Üzüm çekirdeği gibi doğal antioksidanların organizma üzerindeki etkilerinin ortaya çıkartılabilmesi için canlı hayvan deneyleri kaçınılmazdır. Araştırmamızın sonucunda hem in vitro hem de in vivo deneylerle elde edilen sonuçların karşılaştırılma imkânı sağlanmıştır. Ayrıca fonksiyonel testlerle morfolojik değişimin fonksiyon ile ilişkisi de ortaya konulmuştur.

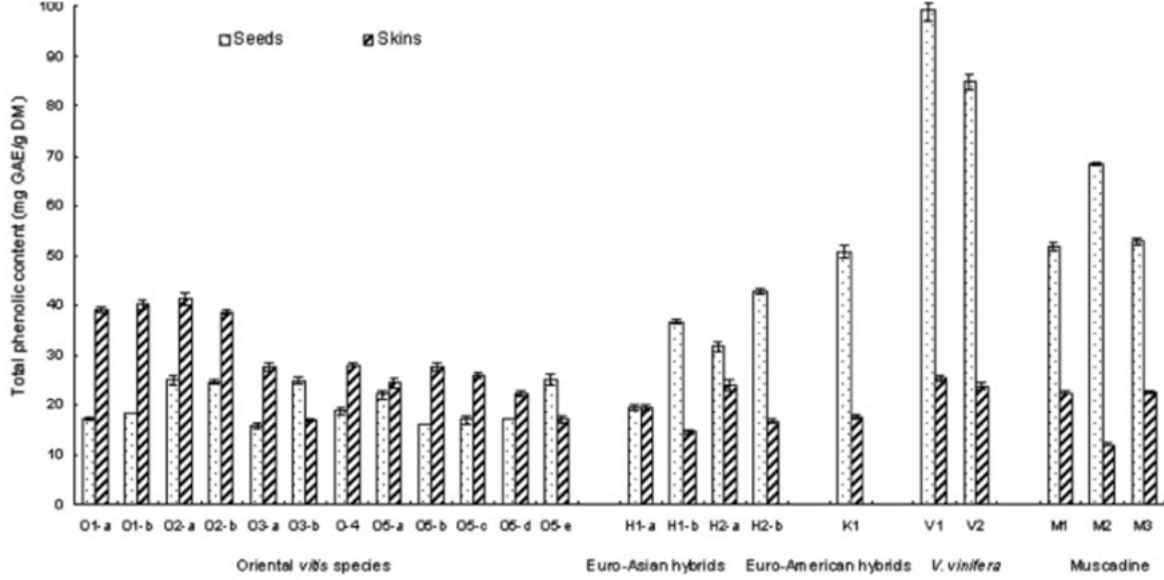
Daha önce yapılmış araştırmaların sonucu olarak üzüm çekirdeğinin antioksidan içeriği bilinen bir gerçektir (YILMAZ, 2004). Ancak bu özellik üzümün yetiştiği ortam ve mevsim farklarının yanı sıra tür ve toprak özelliklerinden etkilenmektedir (XU, 2010). Bu nedenle araştırılacak üzüm çekirdeğinin özelliklerinin ve içeriğinin tanımlanmış olması gerekmektedir. Bu araştırma sırasında da kullanılacak üzüm çekirdeği türüne karar verilirken ön deneyler yapılarak kullanılacak üzüm çekirdeği özellikleri ortaya konuldu. Ticari olarak üretilip pazarlanan yurt dışı menşeli üzüm çekirdeği özütlerinin çalışılması yerine toplum yararı ve ekonomik katkı prensibinden hareketle Denizli çevresinde yetişen üzümün çekirdekleri tercih edildi. Çekirdek kaynağı olarak, yörede yaygın olan pekmez ve şarap yapımı yan ürünü olan atıkların değerlendirilmesi amaçlandı. Yapılan inceleme sonunda pekmez atığı üzüm çekirdeklerinin daha yüksek oranda fenolik madde içerdiği ve daha yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu görüldü. Bu sonucun nedeni şarap üretimi sırasında uygulanan “cibre fermentasyonu” esnasında çekirdeklerde bulunan fenolik bileşiklerin şaraba doğru kütle transferinin olmasıdır (FERNÁNDEZ-PACHÓN, 2004, OUA,

2006). Şarabın fenolik madde içeriği artıp, antioksidan aktivitesi yükselirken; presleme sonrasında elde kalan çekirdeklerin fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi azalmaktadır. Kütle transferinin fermantasyonun erken aşamalarında gerçekleştiğine dair kanıtlar da vardır (ROGINSKY, 2006). Pekmez üretiminde ise üzümler sıra elde etmek için hemen preslenir. Presleme çekirdeklerin fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkili değildir. Bu nedenle pekmez atığı üzüm çekirdeklerinde antioksidan özellik daha yüksektir.

Liyofilizasyon sırasında verimliliği etkileyen faktörlerden birisi de çözücülerdir. Bu konuda kullanılan çözücüler arasında yapılan karşılaştırmada su, saf etanol, %75 etanol, aseton, %70 aseton, metanol, n-butanol, dietil eter, etil asetat ve son iki maddenin kombinasyonu ile yapılan ekstraksiyonlarda metanolün kateşin, epikateşin ve epigallokateşin ekstraksiyonu açısından, %70 asetonun prosiyanidinler açısından, %75 etanolun gallik asit açısından en iyi çözücüler olduğu yönünde bulgular yayınlanmıştır (KALLITHRAKA, 1995). Çalışmamızda kullanılan çözücü % 70 metanol olduğu için üzüm pekmezi atığı üzüm çekirdeklerinden elde ettiğimiz LÜÇÖ'de kateşin ve epikateşin oranının yüksek olması olağan görünmektedir (Şekil 17). Bu sonuç üzüm çekirdeği özütü ile yapılacak çalışmalarda, özütün hazırlanması sırasında kullanılacak çözücünün önemini ortaya koymaktadır. İlgilenilen antioksidan maddenin özüt içindeki oranını artırma açısından solvent tercihi önemlidir.

Elde ettiğimiz LÜÇÖ'nün özelliklerinin sınanması için yapılan in vitro deneylerde elde edilen sonuçlarda toplam fenolik madde ve FRAP yöntemi ile elde edilen antioksidan özellik düzeyleri açısından literatür ortalamalarına yakın sonuçlar elde edildi. Xu ve arkadaşlarının 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, Çin'de yetiştirilen üzüm türleri fenolik madde ve FRAP yöntemi ile antioksidan özellikler saptanmıştır (XU 2010). Bu çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda elde edilen LÜÇÖ'nün Euro-Amerikan hibridler ve muskadin içeriğine yakın fenolik madde içeriği bulunmaktadır (Tablo 5, Şekil 43). Bizim çalışmamızda kullanılan üzüm çekirdeklerinin, *vitis vinifera* L. Cv. Çalkarası üzümlerine ait olmasına rağmen Xu ve arkadaşlarının çalışmalarındaki *vitis vinifera* üzümlere ait fenolik içeriğin ancak yarısı kadar bir içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Bu da üzümün yetiştirilme ortamının yanı sıra türün çeşitliliğinden kaynaklanacağı gibi, Xu ve arkadaşlarının doğrudan taze üzüm çekirdeği üzerinde çalışmalarının sonucu da olabilir (XU 2010). Bizim uyguladığımız ekstraksiyon ve liyofilizasyon yöntemlerin fenolik içeriğin kaybın yol açması muhtemeldir. Ayrıca yan ürün olan pekmez atığı çekirdekleri kullanmamız da bu sonucu doğrulmuş olabilir. Ayrımın yapılabilmesi için Xu ve arkadaşlarının yaptığı

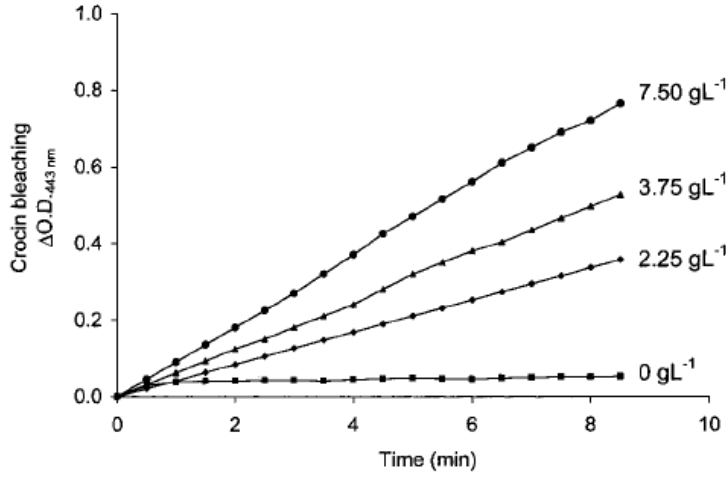
çalışmaya benzer bir karşılaştırma çalışması ile taze ve yan ürün üzüm çekirdeklerinin içerikleri araştırılmalıdır.



Şekil 43: Literatürden alınan bu tabloda Xu ve arkadaşları tarafından Çin’de yetiştirilen üzümlerde yapılan fenolik madde miktarı tayininde Euro-Amerikan hibridler ve muskadin çekirdeklerinin fenolik içeriğinin çalışmamızda elde edilen LÜÇÖ içeriğine (54.6 ± 6.4 mg Gallik Asit Eşdeğeri/g kuru madde) yakın düzeyde olduğu görülmektedir (Xu, 2010).

Bu çalışma sırasında stok olarak bekletilen LÜÇÖ solüsyonlarının enjeksiyonu sonucu sıçanlarda ortaya çıkan yavru kaybı ve ölümlerin aydınlatılması için, bekletilmiş LÜÇÖ solüsyonlarında oksidan özellik olup olmadığının tayini için literatürde belirtilen yöntemin uygulanmasında başarı elde edilemedi. Bunun için tercih edilen krokin ağarması ile hidrojen peroksitli ortamda oksidan aktivite tayinine çalışıldı. Şekil 44’de Manzocco ve arkadaşlarının saffrondan saflaştırılmak suretiyle elde edilen krokinin farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucunda elde ettikleri renk ağarmasına ait grafik görülmektedir (MANZOCCO, 2002). Literatürden alınan bu grafiğe göre ilgili çalışmada hidrojen peroksit konsantrasyonu arttıkça renk ağarması belirgin bir biçimde artmaktadır. Çalışmamızda ise çok yüksek konsantrasyonlarda dahi krokinde literatürdekine uygun şekilde bir renk açılması elde edilemedi (Şekil 22). Bunun olası nedenleri üzerine araştırmalarımız devam etmektedir. Çalışma fosfat tamponu, saf su, metanol ve etanol içerisinde de denenmiş ancak farklılık gözlenmedi. Dolayısı ile Manzocco ve arkadaşlarının rapor ettiği şekildeki bir grafik elde

etmek mümkün olmadı, saf su ve LÜÇÖ gibi diğer bileşiklerin oksidan aktivitelerinin nicel analizleri elde edilemedi (MANCOZZO, 2002).



Şekil 44: Literatürden alınan grafikte saffrondan saflaştırılmak suretiyle elde edilen krokinin farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucunda elde edilen renk ağarması görülmektedir (MANCOZZO, 2002).

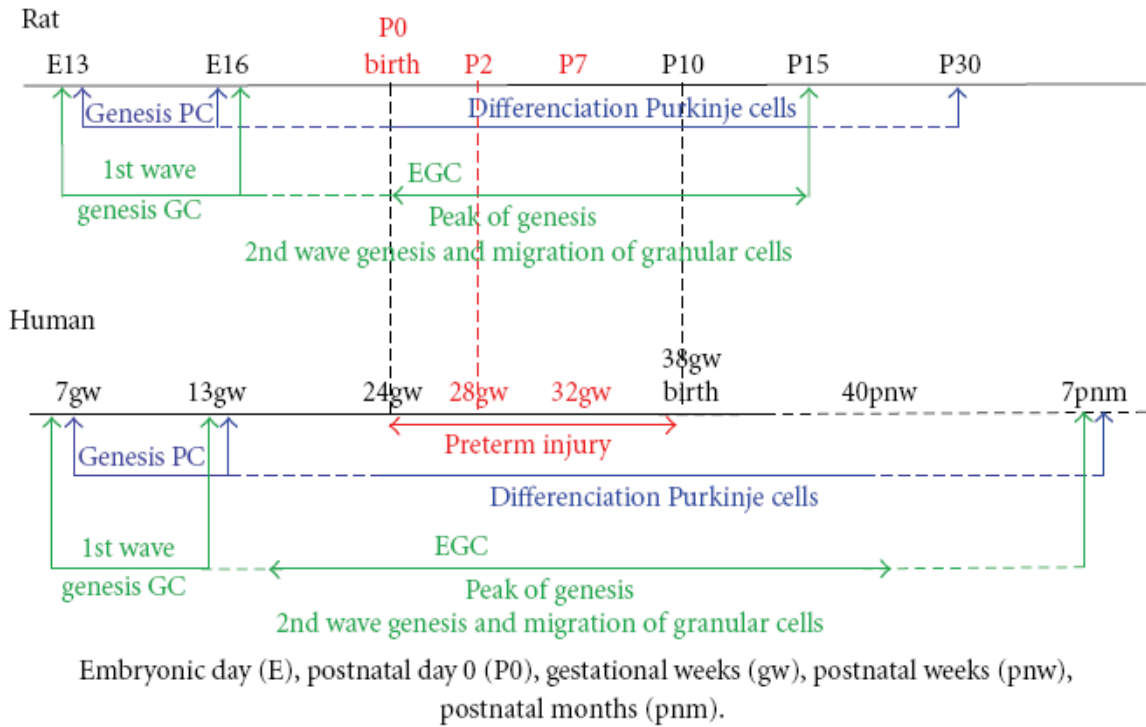
Ayrıca yazarlarla irtibata geçilip, durumun olası nedenleri soruldu. Gelen cevapta “krokinin çok çabuk okside olduğu, muhtemelen henüz çalışmaya başlamadan hava ile temas eden krokinin zaten okside olduğu için beklenen reaksiyonu vermediği, bu nedenle saffrondan saflaştırılacak krokin ile çalışılmasının sorunu çözeceği” önerisi yapıldı (Lara Manzocco, e-mail, 8 Ekim 2010). Safronla yapılan deneylerde de sonuç alınamamıştır. Bu konunun ayrı bir çalışma içinde yürütülmesi daha uygun olduğundan daha ileri aşamalar geçilmedi.

Eritrositler üzerinde yapılan antioksidan etkinlik değerlendirmesinde LÜÇÖ uygulanan hidrojen peroksit (oksidan) etkisindeki eritrositlerin deformabilite kapasitelerinde değişim olmaması LÜÇÖ'nün in vitro ortamda antioksidan olarak görev yapmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak her ne kadar doğal oluşmuş hücreler olsa da damar dışına çıkartılan eritrositlerin davranışları damar içindeki gibi değerlendirilemez. Damar içinde bulunan eritrositler oksijen azlığında veya stres altında deformabilitelerini artırabilirler (ADIGUZEL, 2006). Adıgüzel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada penisilin ile indüklenmiş epilepsi nöbeti geçiren sıçanlarda yapılan araştırmada eritrosit deformabilitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Burada gelişen solunum distressinin oluşturduğu hipoksik etki açıktır. Ancak in vitro oluşturulan oksidatif

stresin eritrosit deformabilitesini bozduğu bilinmektedir (AYDOGAN, 2008). Yine benzer bir olay melatonin için de geçerlidir. Melatoninin güçlü bir antioksidan olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir (HARDELAND, 2005; DIKMENOGLU, 2008). İn vitro oluşturulan oksidatif streste oluşan deformabilite bozulması eritrositlerin melatonin ile inkübasyonu ile düzelmemiştir (DIKMENOGLU, 2008). Bu literatür bilgisi ışığında in vitro yapılan oksidatif stres ile elde edilen bulguların in vivo ortama uyarlanması bire bir mümkün görülmemektedir. In vivo oluşan ortamda endojen antioksidan savunma mekanizmaları gibi diğer faktörlerin etkenin ortaya çıkaracağı sonuçları etkilediği anlaşılmaktadır.

LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan sıçanlarda plazma ve beyin dokusunda yapılan TAS ve TOS düzeyi ile ilgili yaptığımız deneyden elde edilen sonuçlara dayanarak LÜÇÖ'nün antioksidan özelliğinin in vivo olarak plazmada ortaya çıktığı söylenebilir (Tablo 7, Tablo 8). Burada kullandığımız LÜÇÖ veriliş yolu parenteraldir. Genelde literatürde bildirilen yol ise enteral yoldur (RAY, 2000). Bizim çalışmamızda parenteral yolun tercih edilme nedeni LÜÇÖ dozunun standardizasyonunun sağlanması kaygısıdır. Uygulamanın yapıldığı yavru sıçanların henüz ağızdan besleme için gelişimlerini tamamlamamış olmaları da bir diğer nedendir. Bu nedenle çalışmamızda erişkin sıçanlarda yapılan deneylerde de parenteral yoldan LÜÇÖ verilmesinde tercih edilmiştir. Bir dozluk enjeksiyondan sonra plazmada yapılan testler kontrol grubuna göre anlamlı bir TAS artışına yol açmıştır (Tablo 7). Ancak bir veya yedi günlük LÜÇÖ enjeksiyonunun beyin dokusunda TAS açısından değişiklik yaratmaması, kan beyin bariyerinin LÜÇÖ içinde bulunan büyük moleküllü antioksidan maddelerin beyin dokusuna geçememesinden kaynaklanabilir. Zayıf bir olasılık olarak deney sırasında kanın alınmasından sonra damarların yıkanması da bir neden olabilir (Bkz Gereç Yöntem sayfa 27). Ancak LÜÇÖ enjeksiyonu sonrası beyin dokusunda TAS düzeyinin değişmemesi yaptığımız deneyin kurgusunda hata olduğu anlamına gelmez. Çünkü oksidan stres altındaki beyin dokusuna taşınan kan plazmasında bulunacak antioksidan maddelerin stres altındaki dokunun çevresinde yaratacağı etkinin dolaylı olarak dokuya yansıtacağını düşünüyoruz. Bunun için plazmada elde edilen TAS yükselmesi deneyin güvenilirliği açısından olumlu bir veri olarak değerlendirilmiştir. Literatürde de erişkin sıçanlara oral yoldan verilen üzüm çekirdeğinden elde edilmiş proantosiyanidin'in (75mg/kg) beyin dokusunda (hipokampus) superoksit dismutaz aktivitesini anlamlı bir düzeyde artırdığı rapor edilmiştir (DEVI, 2006). Adı geçen çalışmada proantosiyanidin'in endojen antioksidan mekanizmaları harekete geçirdiği öne sürülmektedir. Bu ve benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlar da bu hipotezi destekler niteliktedir (BAGCHI, 2000).

Araştırmanın ikinci kısmını oluşturan, yenidoğan sıçanlarda HİE uygulanması ile oluşturulan yenidoğan hipoksik iskemik ensefalopati modelinde 12 günlük sıçan yavruları kullanılmıştır (ROMIJN, 1991). Literatürde rapor edilen benzer çalışmalarda genellikle 7 günlük sıçan yavrularının kullanıldığı görülmektedir (WANGA, 2008; MISHIMA, 2005). Ancak insan ve sıçan, fetal gelişim kronolojisi açısından karşılaştırıldığında 7 günlük sıçanlar insanda gebeliğin 32.haftasına karşılık gelmektedir (Şekil 45). Eğer uygulanacak model ile miadında yenidoğan insan fetüsü taklit edilecek ise sıçan fetüsünün doğumdan sonraki 12. günü insanda miadında (term) fetüse karşılık gelmektedir (SQUIRE, 1987; MISHIMA, 2005). Buna rağmen yedi günlük sıçan yavruları ile yapılan çalışmaların yeni doğan dönemi olarak değerlendirilmesi doğru bir yaklaşım olarak görülmemektedir. Doğumdan sonra 7. günün tercih edildiği çalışmalar Şekil 45’de de görüleceği üzere insandaki preterm döneme daha uygundur.



Şekil 45: Biran ve arkadaşlarının yaptığı derlemeden alınan bu kronolojik grafikte insan ve sıçan fetüsündeki dönemsel özellikler karşılaştırılmaktadır. Serebellum açısından yapılan karşılaştırma beyinin diğer bölümleri açısından da benzerlik göstermektedir (BIRAN, 2012).

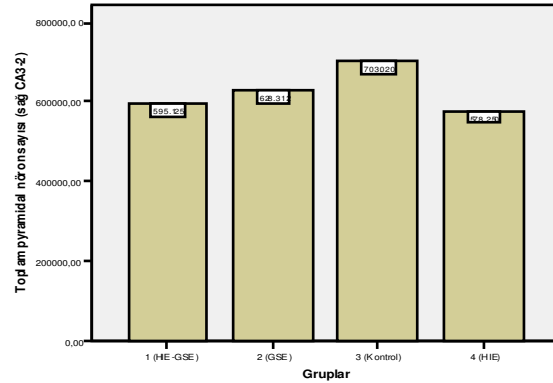
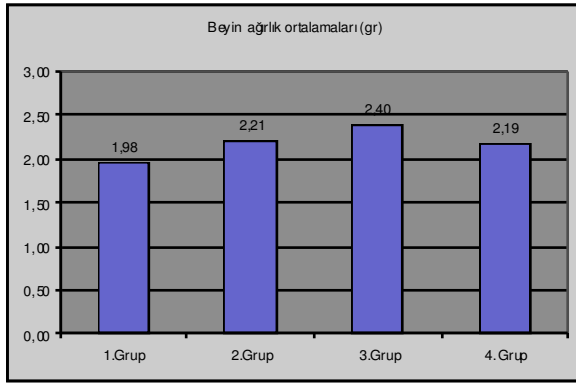
Hipokampustaki oluşan bellek hasarı ile ilgili testlerde, erişkin hale gelen HİE uygulanmış sıçanların öğrenme performansları Morris su tankı testi ve sekiz kollu labirent testi ile kontrol

edildi. Genel olarak elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında tüm gruplarda test uygulamasının sonunda tüm sıçanların test sürecinde amaçlanan davranışı öğrendiği görülmektedir (Şekil 26-32). Ancak öğrenmenin süre, yol uzunluğu, hata sayısı gibi parametrelerin ortalamaları gruplar arasında farklılık göstermektedir. Sonuçta öğrenmenin gerçekleşmesi HİE modeli ile oluşturulan beyin hasarının öğrenme fonksiyonunu tamamen ortadan kaldırmadığının bir kanıtıdır. Bu araştırmanın sonucunda 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 kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir fark bulundu (Tablo 10, Şekil 25, Şekil 26). 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 uygulamasının başarısız olduğu yönünde bir şüpheyi de doğurmaktadır. Beyin ağırlıkları açısından yapılan karşılaştırmada HİE uygulanan 4. grup sıçanların kontrol grubuna göre daha düşük beyin ağırlığı ortalamasına sahip olması, bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olması bu şüpheyi ortadan kaldırmaktadır. Deney hazırlıkları aşamasında LÜÇÖ verilen sıçanlarda görülen yavru kaybı ve ölümlerin görülmesi de göz önüne alındığında (Bkz. Gereç Yöntem sayfa 28) HİE oluşturulan sıçanlarda LÜÇÖ enjeksiyonunun hasarı daha da artırdığı ortaya çıkmaktadır. 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 (MISHIMA, 2005). Bizim çalışmamızda da HİE uygulanan grubun doğru sayısının diğer gruplara göre az olduğu Şekil 29'da görülmektedir. Bu karşılaştırmada 3. Grup (Kontrol grubu) ile 4. Grup (HİE) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.04$). Kontrol grubu (4. Grup) ile 1. ve 2. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması ($p>0,05$), LÜÇÖ tedavisinin iyileştirici bir etkisi olduğu anlamına gelebilir. Ancak su tankı testinde aynı sonucun elde edilememesi bu tespiti zayıflatmaktadır.

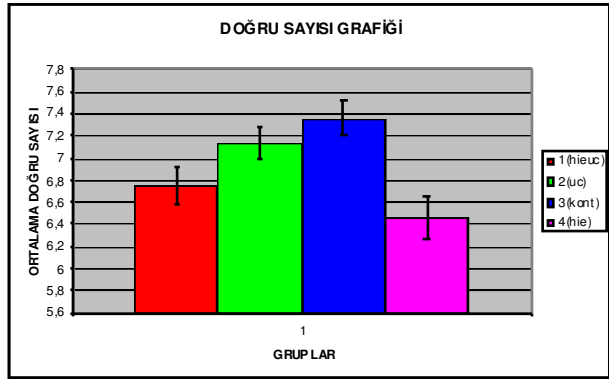
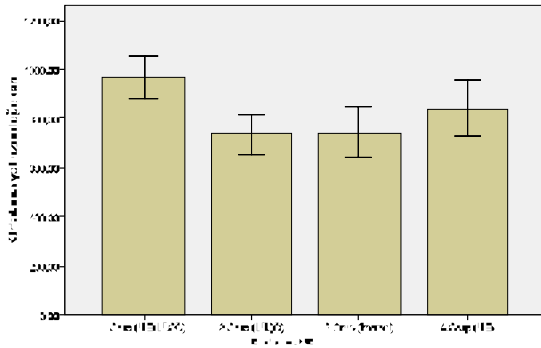
Deneyel HİE oluşturulan sıçanlarda beyin ağırlığı ve hacmindeki azalma daha önceki çalışmalarda da gösterilmiş bir bulgudur (VADIM, 2003). Bu azalma dokudaki büyük defektlerin yanı sıra daha ılımlı kayıpları da içermektedir. Vadim ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada a.carotis communis ligasyonunun yanı sıra 30 ve 60 dakikalık hipoksi uygulanan iki gruptaki infarkt alanlarının karşılaştırılmasında 60 dakika hipoksi uygulanan grupta infarkt alanının daha geniş olduğu gösterilmiştir (VADIM, 2003). Benzer çalışmalarda

da infarkt alanı veya hipoksik iskemiden etkilenen beyin dokusu mm² olarak ölçülmüş ve öğrenme-bellek azalması ile ilişkisi araştırılmıştır (MISHIMA, 2005). Mishima ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu durum hem MRI görüntüleri, hem de post-mortem beyin kesitlerinde yapılan ölçümler ile ortaya konulmuş, hasarın zamanla 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 12). Bu durum öğrenme testleri sonuçları ile paralellik göstermektedir (Şekil 46).



A

B



C

D

Şekil 46: Çalışmamızda elde bulgulara göre beyin ağırlığı (A), hipokampus CA3-2 bölgesindeki piramidal nöron sayısı (B), su tankı testinde ortalama yol uzunluğu (C) ve sekiz kollu labirent testinde ortalama doğru sayısı çubuk grafikleri karşılaştırıldığında her dört parametrenin de birbiri ile uyum gösterdiği görülmektedir. Gruplar içinde en az beyin ağırlığı olan 1.Grubun öğrenme testlerinde de 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

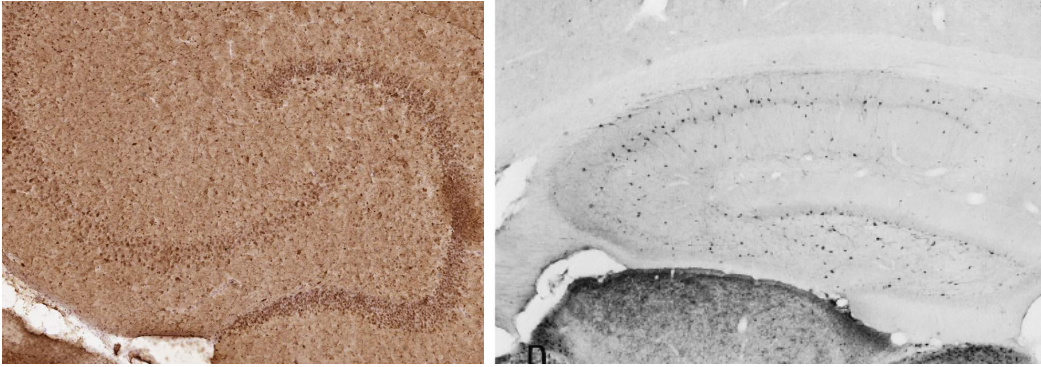
çalışmamızda birkaç kat fazla olduğu halde elde edilen sonuçların benzer olması ve istatistiksel olarak anlamlı bulunması bu varsayımı güçlendirmektedir (IKEDA, 2004).

Sağ hipokampus Ca3-2 bölgesinde yapılan piramidal hücre sayımı sonucu elde edilen bulgular gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını göstermiştir. 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 (PALMER 1990). HİE hayvan modellerinde yapılan tek taraflı karotis ligasyonu aynı taraf beyin hemisferlerinde değişik oranlarda doku hasarı ile sonuçlanmaktadır (PALMER, 1990; FENG, 2005; FENG 2007). 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 (FENG, 2005; FENG, 2007). Adı geçen çalışmalarda sadece LÜÇÖ enjeksiyonu yapılan kontrol grubu olmaması da dikkat çekicidir. Bu açıardan 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 dönem hem de kısa dönem serebral hasarın değerlendirildiği 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 olur.

İmmunohistokimyasal yöntemlerle yaptığımız incelemede hücre içi kalsiyum homeostasisinde rol oynayan kalsiyum bağlayan proteinlerin yapılan deneysel müdahale ile etkilendiği görülmektedir. Bu konuda daha önce yapmış benzer çalışmaya rastlanmaması nedeni ile bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır. Bu etkilenme HİE+LÜÇÖ tedavisi uygulanan sıçanlarda sağ hipokampus CA3-2 bölgesindeki Parvalbumin pozitif piramidal hücreler açısından artma, NeuN pozitif piramidal hücreler açısından ise azalma şeklindedir.

İstatistiksel olarak anlamlı olan bu farklılığın hipokampal sinir hücrelerinin hasar ve tedaviden aynı oranda etkilenmediklerini göstermektedir. Calretinin boyanması ise yalancı pozitif olarak değerlendirildiği için çalışmaya dâhil edilmemiştir (Şekil 47).

Von Bohlen und Halbach tarafından yapılan derlemede erişkin sıçanların hipokampusunda kalsiyum bağlayan proteinlerin açısından pozitif boyanan sinir hücrelerinin nöroenez ile ilişkisi tartışılmıştır (VON BOHLEN UND HALBACH, 2007). Bu literatüre göre NeuN'in gyrus dentatus'daki postmitotik immatür ve matür granüler hücreleri boyadığı bildirilmektedir. Gyrus dentatus'un erişkin dönemde de nöroenez açısından aktif olduğuna dair bulgular vardır. Ancak hipokampus CA bölgeleri için böyle bir görüş bulunmamaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda NeuN pozitif sinir hücresi azalmasını açıklayacak bir görüş öne sürmek için ileri çalışmalarla ihtiyaç vardır. Parvalbumin immunoreaktivitesi ile ilgili olarak Jenkins ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yenidogan sıçanlarda lippolisakkarid ile uyarılan patolojide hipokampus CA3-2 bölgelerinde parvalbumin pozitif hücrelerde azalma görüldüğü bildirilmiştir (JENKINS 2009). Bu sonuçla karşılaştırıldığında her ne kadar deney protokolü farklı olsa da hasar oluşan beyinde parvalbumin pozitifliğinde azalma olduğu gösterilmiştir. LÜÇÖ'nün hasarlı beyin dokusunda Parvalbumin pozitifliğinde artışa neden olduğu bulgusu kuvvetlenmektedir.



Şekil 47: Solda çalışmamızda elde edilen hipokampus kesitinde Calretinin boyanmasına ait örnek, sağda ise Gelo ve arkadaşlarının çalışmasından alınan Calretinin boyalı hipokampus kesiti görüntüsü yer almaktadır (GELO, 1997). Çalışmamızda ortaya çıkan Calretinin boyanmasının yalancı pozitif olduğu kanaati ile bu boyaya ile elde edilen görüntüler değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular özetlendiğinde:

Bu çalışma dâhilinde üretilen LÜÇÖ'nün antioksidan özelliği hem in vitro hem de in vivo olarak gösterildi.

Öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından HİE'li sıçanlarda LÜÇÖ tedavisi su tankı testinde iyileşme sağlamazken, sekiz kollu labirent testinde sadece HİE'li gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere daha iyi sonuçlar elde edildi.

LÜÇÖ tedavisi yapılan HİE'li sıçanlarda hipokampusdaki doku kaybı, kontrol grubu ve HİE'li gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulundu.

LÜÇÖ tedavisi uygulanan HİE'li sıçanlarda sağlam hemisferlerdeki hipokampus CA3-2 bölgelerindeki piramidal nöron sayıları bakımından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Hipokampusta CA3-2 bölgesindeki Parvalbumin pozitif, NeuN pozitif piramidal hücreler HİE ve LÜÇÖ tedavisine karşı farklı duyarlılığa sahip olduğu gösterildi. HİE'li sıçanlarda LÜÇÖ tedavisi Parvalbumin pozitifliğinde artışa, NeuN pozitifliğinde azalmaya neden oldu.

Bu bulgular doğrultusunda sonuç olarak:

- Araştırmamız dâhilinde üretilen LÜÇÖ'nün literatürde bildirilen düzeylerde antioksidan özellikleri vardır.
- Uzun dönemli öğrenme testleri açısından HİE'li sıçanlarda LÜÇÖ tedavisi sekiz kollu labirent testinde performansı olumlu yönde etkilemektedir.
- HİE'li yenidoğan sıçanlarda LÜÇÖ enjeksiyonu beyin dokusu kaybı açısından olumsuz etki göstermektedir.
- Lüçö tedavisi HİE'li sıçanların hipokampusCA3-2 bölgelerindeki piramidal nöronlarda Parvalbumin pozitifliğinde artışa, NeuN pozitifliğinde azalmaya neden olmaktadır.

Öneriler:

- Bu çalışma ile elde edilen bulguların daha ileri aşamalara taşınması için değişik labortuvarlarda tekrarlanması gereklidir. Ancak elde edilen sonuçların güvenilirliği sağlandıktan sonra toplumla paylaşılmalıdır. Günümüzde yaygınlığı giderek artan üzüm çekirdeği veya diğer antioksidan olduğu iddia edilen bitkisel ürünlerin güvenilirlik sınırları saptanmadan tüketilmesi teşvik edilmemelidir. Elde ettiğimiz deneyim sonucunda bundan sonra yapılacak üzüm çekirdeği çalışmalarında aşağıdaki önerilerin dikkate alınması elde edilecek sonuçların güvenilirliği ve zaman tasarrufu açısından önemlidir.

- Üzüm çekirdeği özütü ile yapılacak çalışmalarda, özütün hazırlanması sırasında kullanılacak çözücüler, çalışmanın amacına göre seçilmelidir. İlgilenilen antioksidan maddenin özüt içerisindeki miktarı kullanılan çözücü ile bağlantılıdır.
- Üzüm çekirdeği kaynağı seçilirken dikkat edilmelidir. Taze üzüm çekirdekleri üzüm türü ve üretim şartlarına göre, yan ürün olan çekirdekler ise geçirildikleri işlemlere göre değişen oranlarda antioksidan içeriğe sahiptir. Ayrımın yapılabilmesi için Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer bir karşılaştırma çalışması ile taze ve yan ürün üzüm çekirdeklerinin içerikleri araştırılmalıdır (XU, 2010).
- Antioksidan aktivite tayini ile ilgili çalışmalarda beyin dokusunda TAS-TOS yerine malondialdehid, katalaz, superoksit dismutaz gibi endojen antioksidan sistem parametrelerine bakılmalıdır.
- HİE araştırmalarında kullanılacak sıçan sayıları literatürde de rastlandığı üzere her grup açısından anlamlı sonuçlar elde edilen deneylerdeki düzeyde tutulmalıdır. Böylece farklılıkların anlamlılık düzeyi artabilir.
- HİE’de kısa dönem ve uzun dönem serebral hasarın değerlendirileceği deneysel çalışma yapıp, LÜÇÖ’nün her iki dönem açısından tedavi edici etkisi araştırılmalıdır. Böylece literatürde kısa dönemde olumlu etki yapıyor gibi görünen LÜÇÖ’nün uzun dönemde olumsuz etkili olabileceği yönündeki olasılık netleştirilmiş olur.
- Oral olarak verilen LÜÇÖ ile parenteral verilen LÜÇÖ tedavisi arasındaki farkın araştırılması gereklidir.
- Sekiz kollu labirent ve su tankı öğrenme testleri açısından bu çalışmada ortaya çıkan tutarsız sunucun güvenilirliğinin sağlanması için deney tekrar edilmelidir.

KAYNAKLAR

- ADIGUZEL, E., Duzcan, SE., Akdogan, I., Tufan, AC., A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate, *Neuroanatomy*, , 2: 6-8, (2003).
- ADIGUZEL, E., Kucukatay, V., Erken, G., Yonguc, N., Bor-Kucukatay, M., Effect of penicillin G induced epileptic seizures on hemorheological parameters in rats, *Life Sciences*, 79:2382-2386, (2006).
- AMATO, M., Donati, F., Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions, *Eur J Paediatr Neurol*, 4(5):203-209, (2000).
- ANNUNZIATO, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., Di Renzo, GF., Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions, *Toxicology Letters*, Issues 2–3, 4 April, 139:125-133, (2003).
- AYDOGAN, S., Yapislar, H., Artis, S., Aydogan, B., Impaired erythrocytes deformability in H₂O₂- induced oxidative stress: protective effect of L-carnosine, *Clin Hemorheol Microcirc*, 39(1-4):93-8, (2008).
- BAENA, RC., Busto, R., Dietrich, WD., Globus, MY., Ginsberg, MD., Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia, *Neurology*, 48:768-773, (1997).
- BAGCHI, D., Bagchi, M., Stohs, SJ., Das, DK., Ray, SD., Kuszynski, CA., Joshi, SS., Pruess, HG., Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention, *Toxicology*, 148:187–197, (2000).
- BAGCHI, D., Garg, A., Krohn, RL., Bagchi, M., Tran, MX., Stohs, SJ., Oxygen free radical scavenging abilities of Vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 95:179–190, (1997).
- BAKER, CJ., Onesti, ST., Solomon, RA., Reduction by delayed hypothermia of cerebral infarction following middle cerebral artery occlusion in the rat: a time course study, *J Neurosurg*, 77:438-444, (1992).
- BASSAN, H., Gauvreau, K., Newburger, JW., Tsuji, M., Limperopoulos, C., Soul, JS., Walter, G., Laussen, PC., Jonas, RA., du Plessis, AJ., Identification of pressure passive cerebral perfusion and its mediators after infant cardiac surgery, *Pediatr Res.*, 57(1):35-41, (2005).
- BELAYEV, L., Zhao, W., Busto, R., Ginsberg, MD., Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture, I, Three-dimensional autoradiographic image analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation, *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 1266-1280, (1997).
- BIRAN, V., Verney, C., Ferriero, DM., Perinatal Cerebellar Injury in Human and Animal Models, *Neurology Research International*, Volume 2012, Article ID 858929, 9 pages, (2012).
- BODSCH, W., Barbier, A., Oehmichen, M., Grosse Ophoff, B., Hossmann, KA., Recovery of monkey brain after prolonged ischemia, II, Protein synthesis and morphological alterations, *J Cereb Blood Flow Metab*, 6:22-33, (1986).

- BUONOCORE, G., Perrone, S., Bracci, R., Free radicals and brain damage in the newborn, *Biol. Neonate*, 79: 180–186, (2001).
- BURSCH, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Torok, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R., Hermann, RS., Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy, *Carcinogen*, 17:1595-1607, (1996).
- CHEN, J., Weinstein, PR., Graham, SH., Attenuation of postischemic brain hypoperfusion and reperfusion injury by the cyclooxygenase-lipoxygenase inhibitor BW755C, *J Neurosurg*, 83:99-104, (1995).
- CHOI, DW., Koh, JY., Zinc and brain injury, *Annu Rev Neurosci*, 21:347-375, (1998).
- CLARKE, PGH., Developmental cell death, morphological diversity, and multiple mechanisms, *Anat Embryol*, 181:195-213, (1990).
- COHEN, NJ., Eichenbaum, H., *Memory, Amnesia, and the Hippocampal System*. MIT Press, Cambridge, (1993).
- COOPER, HK., Zalewska, T., Kawakami, S., Hossmann, KA., Kleihues, P., The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain, *J Neurochem*, 28:929-934, (1977).
- CRUMRINE, RC., LaManna, JC., Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat, *J Cereb Blood Flow Metab*, 11:272-282, (1991).
- Da SILVA, JMR., Darmon, N., Fernandez, Y., et al., Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds, *J Agric Food Chem*, 39:1549–1552, (1991).
- DANI C., Cecchi A., Bertini G., Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant, *Minerva Pediatrica* August;56(4):381-94, (2004).
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., Mishra, OP., Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention, *J Pediatr*, 132:30-34, (1998).
- DEVI, A., Jolitha, AB., Ishii, N., Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats, *Med Sci Monit.*, 12(4):124-9, (2006).
- DIENEL, GA., Pulsinelli, WA., Duffy, TE., Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischemia, *J Neurochem*, 35:1216-1226, (1980).
- DIKMENOGLU, N., Ileri, E., Seringec, N., Ercil, D., Melatonin prevents lipid peroxidation in human erythrocytes but augments deterioration of deformability after in vitro oxidative stress, *Clin Hemorheol Microcirc.*, 40(3):235-42, (2008).
- EREL, O., A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, 38:1103–11, (2005).
- EREL, O., A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clin Biochem*, 37:112–9, (2004).
- ERSOY, B., Ozbilgin, K., Kasirga, E., Inan, S., Coskun, S., Tuglu, I., Effect of growth hormone on small intestinal homeostasis relation to cellular mediators IGF-I and IGFBP-3, *World J Gastroenterol*, November 21; 15(43): 5418-5424, (2009).

- ESKES, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., Martinou, J.C., Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the mitochondrial transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions, *J Cell Biol*, 143:217-224, (1998).
- FENG, Y., Liu, Y.M., Fratkins, J.D., LeBlanc, M.H., Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats, *Brain Research Bulletin*, 66:120–127, (2005).
- FENG, Y., Liu, Y.M., Leblanc, M.H., Bhatt, A.J., Rhodes, P.G., Grape seed extract given three hours after injury suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res.*, 61(3):295-300, (2007).
- FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S., Villaño, D., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition, *Analytica Chimica Acta*, Volume 513, Issue 1, 18 June:113–118, (2004).
- FITCH, W., Brain metabolism, In: James, E.C., David, S.S, eds., *Anesthesia and Neurosurgery*, Philadelphia: Mosby, (1994), Pp:1-15.
- FREDERICKSON, C.J., Hernandez, M.D., McGinty, J.F., Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons, *Brain Res*, 480:317-321, (1989).
- GARCÍA-ALIX, A., Martínez-Biarge, M., Diez, J., Gayá, F., Quero, J., Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Incidence and prevalence in the first decade of the 21st century, *An Pediatr (Barc)*, 71(04) :319-26, (2009).
- GELOSO, M.C., Vinesi, P., Michetti, F., Calretinin-containing neurons in trimethyltin-induced neurodegeneration in the rat hippocampus: an immunocytochemical study., *Exp Neurol*. 146(1):67-73, (1997).
- GERMAN, J.B., Nutritional studies of flavonoids in wine. In: Rice-Evans, C.A., Packer, L., (Eds.), *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, (1997), Pp. 343–358.
- GUNDERSEN, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J., Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *ActaPathol, Microbiol Immunol Scand*, 96:379–94, (1988).
- GUNDERSEN, H.J., Jensen, E.B., The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction, *J Microsc* 147:229–63, (1987).
- GUNDERSEN, H.J.G., Stereology of arbitrary particles, A review of number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson, *J. Microsc*, 143:3-45, (1986).
- GUNDERSEN, H.J.G., The Smooth Fractionator, *Journal Of Microscopy*, 3 September, 207:191–210, (2002).
- GUYTON A.C., Hall J.E., *Textbook of Medical Physiology*, Philadelphia: Elsevier Science, (2000).
- HAKIM A.M., Ischemic penumbra: The therapeutic window, *Neurology*, September, 51:S44-S46, (1998).
- HAMMERSTONE, J.F., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.*, 130: 2086S—2092S, (2000).

HAMNER, MA., Möller, T., Ransom, BR., Anaerobic function of CNS white matter declines with age, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31:996–1002, (2011).

HARDELAND, R., Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance, *Endocrine*, July, 27 (2): 119–30, (2005).

HARDEMAN, MR., Goedhart. PT., Dobbe, JGG., Lettinga, KP., Laser assisted optical rotational cell analyzer (LORCA): A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters, *Clinical Hemorheology*, 14:605-618, (1994).

HOCHACHKA, PW., Buck, LT., Doll, CJ., Land, SC., Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9493-9498, (1996).

HOCMAN, G., Prevention of cancer: vegetables and plants, *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, 201–212, (1989).

HOZ, L., Edvard, I., Moser, EI., Morris, RGM., Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal Networks, *European Journal of Neuroscience*, 22:745–754, (2005).

<http://stereoloji.blogspot.com/p/stereoloji-nedir.html>

http://www.disector.com/The-History-Of-Modern-Stereology_c_41.html

<http://www.stereology.info/criteria-for-counting-cells/>

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Flavonoids.svg>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Flavan-3-ol>

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. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 2132-41, (2004).

ISLAM, N., Aftabuddin, M., Moriwaki, A., Hori, Y., Detection of DNA damage induced by apoptosis in the rat brain following incomplete ischemia, *Neurosci Lett*, 188:159-162, (1995).

JENKINS, T.A., Harte, M.K., Stenson, G., Reynolds, G.P., Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat., *Behav Brain Res.*, 205(2):355-9 (2009).

JESPERSEN, SN., Østergaard, L., The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32:264–277, (2012).

JR EDMONDS, HL., Wauquier, A., Melis, W., Van den Broeck, WA., Van Loon, J., Janssen, PA., Improved short-term neurological recovery with flunarizine in a canine model of cardiac arrest, *Am J Emergency Med*, 3:150-155, (1985).

KAGSTROM, E., Smith, ML., Siesjo, BK., Recirculation in the rat brain following incomplete ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 3:183-192 (1983).

KALIMO, H., Olsson, Y., Paljarvi, L., Soderfeldt, B., Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions, *J Cereb Blood Flow Metab* 2, Suppl, 1:S19-S22, (1982).

KALIMO, H., Rehncrona, S., Soderfeldt, B., Olsson, Y., Siesjo, BK., Brain lactic acidosis and ischemic cell damage, 2: *Histopathology*, *J Cereb. Blood Flow Metab*, 1:313-327, (1981).

- KALLITHRAKA, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Bakke, J., Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics, *Phytochemical Analysis*, Volume 6, Issue 5:265–267, (1995).
- KARIBE, H., Zarow, GJ., Graham, SH., Weinstein, PR., Mild intrahemispheric hypothermia reduces post ischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema and neuronal damage after temporary focal ischemia in rats, *J Cereb Blood Flow Metab*, 14:620-627, (1994).
- KLUCK, RM., Bossy-Wetzler, E., Gren, DR., Newmeyer, DD., The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for BCL-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275:1132-1136, (1997).
- KOZUKA, M., Smith, ML., Siesjo, BK., Preischemic hyperglycemia enhances postischemic depression of cerebral metabolic rate, *J Cereb Blood Flow Metab*, 9:478-490, (1989).
- KROEMER, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annu Rev Physiol*, 60:619-642, (1998).
- LEE, JH., Pyon, JK., Lee, SH., Lee, YJ., et al., Greater expression of TC21/R-ras2 in highly aggressive malignant skin cancer, *Int. J Dermatol*, 50:956-960, (2011).
- LEE, JM., Grabb, MC., Zipfel, GJ., Choi, DW., Brain tissue responses to ischemia, *J Clin Invest*, 106(6):723–731, (2000).
- LEE, JM., Zipfel, GJ., Choi, DW., The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms, *Nature*, 399Supp:A7-A14, (1999).
- LEVINE, S., Anoxic–ischemic encephalopathy in rats, *Am. J. Pathol*, 36:1–17, (1960).
- LI, XF., Yan J., Jiang LS., Dai LE., Age-related variations of leptin receptor expression in the growth plate of spine and limb: gender and region-specific changes, *Histochem Cell Biol*, 135:487–497 (2011).
- LIN, S., Rhodes, PG., Cai, Z., Brain Res Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia, *Apr 18;1385:246-56*, (2011).
- LIPTON, P., Ischemic cell death in brain neurons, *Physiol Rev*, 79:1431-1568, (1999).
- LOWRY OH., Rosebrough NJ., Farr AS., Randall RJ., Protein measurement with folin-phenol reagent, *J Biol Chem*, 193:265-273, (1951).
- MAJNO, G., Joris, I., Apoptosis, oncosis and necrosis, An overview of cell death, *Am J Pathol*, 146:3-15, (1995).
- MANZOCCO, L., Calligaris, S., Nicoli, CM., Assessment of Pro-oxidant Activity of Foods by Kinetic Analysis of Crocin Bleaching, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, Via Marangoni 97, 33100 Udine, Italy *J. Agric, Food Chem.*, 50 (10):2767–2771, (2002).
- MATTFELDT, T., Mall, G., Gharehbaghi, H., Moller, P., Estimation of surface area and length with the orientator, *J Microsc*, 159, 301–17, (1990).
- MEMEZAWA, H., Minamisawa, H., Smith, ML., Siesjo, BK., Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat, *Exp Brain Res.*, 89:67-78, (1992).
- MICHENFELDER, JD., Milde, JH., Postischemic cerebral blood flow appears to be determined by cerebral metabolic needs, *J Cereb Blood Flow Metab*, 10:71-76, (1990).

- MILDE, LN., Weglinski, MR., Pathophysiology of metabolic brain injury, In: James, EC., David, SS., eds., *Anesthesia and Neurosurgery*, Philadelphia: Mosby, (1994), Pp:1-15.
- MISHIMA, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., Ikenoue, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment, *Neuroscience Letters* 376:194–199, (2005).
- MORRIS, RGM., Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learn Motiv.* 12:239–60 (1981).
- MURPHY, TH., Schnaar, RL., Coyle, JT., Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake, *FASEB J*, 4:1624-1633, (1990).
- NIXON, RA., Cataldo, AM., Mathews, PM., The lysosomal system in neuronal death: a review, *Ann NY Acad Sci*, 679:87-109 (1993).
- NOMURA, T., Fukuda, T., Aika, Y., Heizmann, CW., Emson, PC., Kobayashi, T., Kosaka, T., Distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference, *Brain Research*, 751:64-80 (1997).
- OGUZ, EO., Conkur, ES., Sari, M., SHTEREOM I simple Windows based software for stereology. Volume and number estimations, *Image Anal Stereol*, 26:45-50, (2007).
- OLESEN, SP., Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain, *Acta Physiol Scand*, 129:181-187, (1987).
- OLTON, DS., Samuelson, RJ., Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Expt Psychol Animal Behavior Processes*, 2:97–116, (1976).
- OUA, HC., Choub, FP., Sheenc, HM., Lina, TM., Yangd, CH., Sheu, WHH., Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells, *Clinica Chimica Acta Volume 364, Issues 1–2, February:196–204*, (2006).
- OZKAN, M., Kırca, A., Cemeroğlu, B., Gıdalar a uygulan an bazı özel analiz yöntemleri. Cemeroğlu, B.(editör), *Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, yayın no:37, Ankara, (2007).
- PALMER, C., Vannucci, R.C., Towfighi, J., Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol, *Pediatr. Res.* 27:332–336, (1990).
- PALSDOTTIR, K., Dagbjartsson, A., Thorkelsson, T., Hardardottir, H., Birth asphyxia and hypoxic ischemic encephalopathy, incidence and obstetric risk factors. *Laeknabladid*,, 93(9):595-601, (2007).
- PARK, WS., Sung, DK., Kang, S., Koo, SH., Kim, YJ., Lee, JH., Chang, YS., Lee, M., Therapeutic window for cycloheximide treatment after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, *J Korean Med Sci.*, Jun;21(3):490-4, (2006).
- PATESTAS, MA., Gartner, LP., *A Textbook of Neuroanatomy*, Blackwell Publishing, 350 Main Street, Malden, MA 02148-5020, USA. (2006).
- PERLMAN, JM., Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury, *Clin Ther.*, Sep;28(9):1353-65, (2006).
- PETERSON EC., Wang, Z., Britz, G., Regulation of Cerebral Blood Flow, *International Journal of Vascular Medicine*, Article ID 823525, 2011:8, doi:10.1155/2011/823525 (2011).

- PETERSON, J., Dwyer, J., Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire, *J Am Diet Assoc.*, 98(6):677-82, 685, (1998).
- PRASAINA,b, JK., Carlson,c,d, SH., Wyss, JM., Flavonoids and age-related disease: Risk, benefits and critical, *Windows Maturitas* 66:163–171, (2010).
- PRESTON, E., Foster, DO., Evidence for pore-like opening of the blood brain barrier following forebrain ischemia in rats, *Brain Res*, 761: 4-10, (1997).
- PULSINELLI, WA., Levy, DE., Duffy, TE., Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia, *Ann Neurol*, 11:499-509 (1982).
- RAY, S., Bagchi, D., Lim, PM., Bagchi, M., Gross, SM., Kothari, SC., Preuss, HG., Stohs, SJ., Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*, 109(3-4):165-97, (2001).
- RAY, SD., Patel, D., Wong, V., Bagchi, D., In vivo protection of dna damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 107(1-2):137-66, (2000).
- REED, JC., Cytochrome c: can't live with it can't live without it, *Cell*, 91:559-562, (1997).
- ROGINSKY, V., de Beer, D., Harbertson, JF., Kilmartin, PA., Barsukova, T., Adams, DO., The antioxidant activity of Californian red wines does not correlate with wine age, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 86, Issue 5, 15 April:834–840, (2006).
- 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.*, 26(1):61-7, (1991).
- SATO, M., Maulik G., Ray, PS., et al., Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury, *J Mol Cell Cardiol*, 31(13) 1289–1297, (1999).
- SCHMIDT-KASTNER, R., Ophoff, BG., Hossmann, KA., Pattern of neuronal vulnerability in the cat hippocampus after one hour of global cerebral ischemia, *Acta Neuropathol*, 79: 444-455, (1990).
- SEIFERT T., Secher NH., Sympathetic influence on cerebral blood flow and metabolism during exercise in humans, *Progress in Neurobiology*, 95:406–426, (2011).
- SIESJO, BK., Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia, Part II: Mechanisms of damage and treatment, *J Neurosurgery*, 77:337-354, (1992).
- SQUIRE, LR., *Memory and Brain*. New York, Oxford, (1987).
- STEN, PA., Milde, JH., Michenfelder, JD., Cerebral metabolic and vascular effects of barbiturate therapy following complete global ischemia, *J Neurochem*, 31:1317-1324, (1978).
- STEREO, DC., The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector, *J Microsc*, 134:127–136, (1984).
- STOLL, BJ., Kleigman, RM., Hypoxia-Ischemia. In: Behrman, RE., Kleigman, RM., Jenson, HB., eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia : WB Saunders Company, (2004), Pp: 566-567.

- TEEL, RW., Modulation of microsomal activity by potential chemoprotective agents of plant origin. *Phytother. Res.*, 6:251–254, (1992).
- TEN, VS., Bradley-Moore, M., Gingrich, JA., Stark, RI., Pinsky, DJ., Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy, *Behavioural Brain Research*, Volume 145(1–2):209-219, (2003).
- THAIPONG, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675, (2006).
- TRUMP, BF., Arstila, AU., Cellular reaction to injury, In: Hill, RB., La Via, MF., eds., *Principles of Pathobiology*, Baltimore: Williams & Wilkins, (1980), Pp: 9.
- TSUDA, M., Imaizumi, K., Katayama, T., Kitagawa, K., Wanaka, A., Tohyama, M., Takagi, T., Expression of zinc transporter gene, ZNT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil, *J Neurosci*, 17:6678-6684, (1997).
- VANNUCCI, RC., Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage, *Pediatr Res*, 27: 317-326, (1990).
- VANNUCCI, RC., Current and potentially new management strategies for hypoxic-ischemic encephalopathy, *Pediatrics*, 85:961-968, (1990).
- VANNUCCI, RC., Palmer, C., Hypoxic ischemic encephalopathy: pathogenesis and neuropathology, In: Fanaroff AA., Martin RJ., eds., *Neonatal-Perinatal Medicine*, Philadelphia: Mosby-Yearbook, (1997), Pp: 856-877.
- VANNUCCI, RC., Perlman, JM., Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy, *Pediatrics*, 100:1004-1014, (1997).
- VANNUCCI, RC., Hypoxia-ischemia: Clinical aspects, In: Fanaroff, AA, Martin RJ., eds. *Neonatal-perinatal medicine IV*, Philadelphia: Mosby-Yearbook, (2000). Pp: 864-879.
- VANNUCCI, SJ., Hagberg, H., Hypoxia–ischemia in the immature brain, *The Journal of Experimental Biology*, 207:3149-3154, (2004).
- VEXLER, ZS., Ferriero, DM., Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury, *Semin Neonatol*, Apr;6(2):99-108, (2001).
- VOLPE, JJ., *Neurology of the Newborn*, fourth ed., W.B. Saunders, Philadelphia, PA, (2001).
- Von BOHLEN und Halbach, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.*, 329(3):409-20 (2007).
- VOPE, JJ., Hypoxia-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis, In: Vope JJ, ed., *Neurology of the newborn*, Philadelphia: WB saunders, (2001), Pp: 296-333.
- WANGA, XL., Zhaob, YS., Yanga, YJ, Xiea, M., Yua, XH., Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic–ischemic brain damage in newborn rats, Volume 1222:87–94, (2008).
- WEBER, ER., Hanekamp, T., Thorsness, PE., Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, and ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. Cervisiae*, *Mol Biol Cell*, 7:307-317, (1996).
- WEST, MJ., Slomianka, L., Gundersen, HJ., Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator, *Anat Rec*, Dec; 231(4):482-97, (1991).

- WIDMANN, R., Miyazawa, T., Hossmann, KA., Protective effect of hypothermia on hippocampal injury after 30 minutes forebrain ischemia in rats is mediated by postischemic recovery of protein synthesis, *J Neurochem*, 61: 200-209, (1993).
- XU, C., Zhang, Y., Cao, L., Lu, J., Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China, *Food Chemistry*, Volume 119, Issue 4, 15 April:1557–1565, (2010).
- YAMAKOSHĪ, J., Kataoka, S., Koga, T., et al., Proanthocyanidin- rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits, *Atherosclerosis*, 142:139–149, (1999).
- YAMAKOSHĪ, J., Saito, M., Kataoka, S., Kikuchi, M., Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, 40(5):599-607, (2002).
- YANG, GY., Betz AL., Chenevert, TL., Brunberg, JA., Hoff, JT., Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats, *Journal of Neurosurgery*, July, 81:93-102, (1994).
- YANG, GY., Betz, AL., Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats, *Stroke*, 25:1658-1665, (1994).
- YANG, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, CN., Ibrado, AM., Cai, J., Peng, TI., Jones, DP., Wang, X., Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 275:1129-1132, (1997).
- YEMIS, O., Bakkalbasi, E., Artik N., Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey, *International Journal of Food Science and Technology*, 43:154–159, (2008).
- YILMAZ, Y., Antioxidant Activities Of Grape Skin And Grape Seed Polyphenolics And Potential Use Of Antioxidants In Foods As A Functional Food Ingredient, (Doktora Tezi), Athens, Georgia, (2002).
- YILMAZ, Y., Toledo, RT., Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins:Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2):255–260, (2004).
- YILMAZ, Y., Toledo, RT., Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, *J Food Compos Anal*, 19: 41–48, (2006).
- ZHAO, W., Belayev, L., Ginsberg, MD., Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture, II, Neurological deficits and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization, *J Cereb Blood Flow Metab*, 17:1281-1290, (1997).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 108S157
Proje Başlığı: Hipoksik-İskemik Beyin Hasarı Modeli Uygulanan Yeni Doğan Sıçanlarda Üzüm Çekirdeği Özütü'nün Öğrenme-Bellek ve Hipokampus'un Histolojik Yapısı Üzerine Etkisi
Proje Yürütücüsü: Esat ADIGÜZEL Araştırmacılar: Mehmet Bülent ÖZDEMİR, Yusuf YILMAZ, Gülçin ABBAN, İzzettin HATİP
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kınıklı, Denizli.
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi, Kınıklı, Denizli.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/10/2008; 15/10/2012
Öz (en çok 70 kelime) Üzüm çekirdeğinde bulunan antioksidan maddelerin yenidoğan sıçanlarda, hipoksik iskemik ensefalopati modeli ile oluşturulan beyin hasarında koruyucu etkisi olup olmadığı araştırıldı. Uzun dönem etkilerin ortaya konulması için erişkin hale gelen hipoksik-iskemik sıçanlarda öğrenme testleri yapıldıktan sonra histopatolojik incelemeler gerçekleştirildi. Sonuç olarak liyofilize hale getirilerek cilt altı enjeksiyonla uygulanan üzüm çekirdeği özütünün hipoksik iskemi modeli oluşturulmuş sıçan yavrularında uzun dönemde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamadığı sonucuna ulaşıldı.
Anahtar Kelimeler: üzüm çekirdeği, antioksidan, hippocampus, sıçan, yenidoğan, hafıza, hipoksi, iskemi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: <ol style="list-style-type: none">Adiguzel E, Yılmaz Y, Bor-Kucukatay M, Kucukatay V, Erken G. In vitro and in vivo antioxidant effect of the grape seed extract in brain tissue, plasma and red blood cell. 10th Sözlü bildiri. Congress of European Association of Clinical Anatomy (EACA), Istanbul, Turkey, September 2-5, 2009. Surgical Radiological Anatomy 2009; 31 Suppl 1, pp 83.Yonguç GN, Özdemir MB, Hatip-Al-Khatip I, Adigüzel E. The effects of grape seed extract on learning and memory in neonatal hypoxic ischemic rats. Sözlü bildiri. XIIIth National Congress of Anatomy, 28th October - 1stNovember 2010, Kyrenia, TRNC. Anatomy 2010; 4 Suppl 2, pp 44.Akyer ŞP, Yılmaz Y, Küçükataç V, Baylan H, Adigüzel E. Antioxidant and oxidant status of aqueous solutions of fresh and stored grape seed extracts. Poster bildiri. XIIIth National Congress of Anatomy, 28th October - 1stNovember 2010, Kyrenia, TRNC. Anatomy 2010; 4 Suppl 2, pp 47.Adiguzel E, Yonguc GN, Yilmaz Y. Effects of grape seed extract on brain weight and CA3-2 pyramidal neuron number of hippocampus in the hypoxic- ischemic neonatal rats: preliminary results. Poster Bildiri, Joint Meeting of Anatomical Societies, 19-22 May 2011, Bursa, Turkey. Anatomy 2011; 5 Suppl 1, pp 119.

5. Özdemir MB, Yonguc GN, Hatip Al-Khatip I, Adiguzel E.. The effects of grape seed extract on learning and Memory. Poster Bildiri. Joint Meeting of Anatomical Societies, 19-22 May 2011, Bursa, Turkey. Anatomy 2011;5 Suppl 1. pp 22.
6. Özdemir MB, Yonguc GN, Hatip Al-Khatip I, Adiguzel E.. The effects of grape seed extract on learning and memory in neonatal hypoxic ischemic rats. Poster Bildiri. 11thCongress of European Association of Clinical Anatomy, Padua, Italy 29th June- 1th July 2011. Surgical Radiological Anatomy 2011; 33 Suppl 1, pp 581.
7. Baylan H. Üzüm çekirdeği özütü ile tedavi edilen hipoksik iskemik ensefalopatili sıçanlarda gyrus dentatus'un stereolojik olarak değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Danışman: Prof.Dr.Esat Adıgüzel. Yazım aşamasında