

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**MELATONİNİN RATLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN TRAVMATİK SEKONDER BEYİN
HASARINDAKİ APOPTOZİS SÜRECİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**DR.CENGİZ GÖLÇEK
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR.M. ARİF ALADAĞ**

MALATYA-2012

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**MELATONİNİN RATLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN TRAVMATİK SEKONDER BEYİN
HASARINDAKİ APOPTOZİS SÜRECİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**DR.CENGİZ GÖLÇEK
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. M. ARİF ALADAĞ**

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 210/137 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ'a, uzmanlık eğitimim süresince bilgi, birikim ve deneyimlerini aktararak bu disiplinde yetişmemi sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Ayhan KOÇAK, Prof. Dr. Süleyman R. ÇAYLI, Prof. Dr. S. Çağatay ÖNAL, Yrd. Doç. Dr. M. Namık ÖZTANIR'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hakan PARLAKPINAR'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Musa KARAMAN ve Doç. Dr. Hasan ÖZER'e, mesai arkadaşlarım Dr. Tuncay Ateş'e, Dr. Gökhan REŞİTOĞLU'na, Dr. A. Alper TAKMAZ'a, Dr. Ahmet YARDIM'a, Dr. Yener AKYUVA'ya, Dr. Ramazan PAŞAHAN'a ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma, maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme, ihtisas sürem boyunca sabır ve destekleri için sevgili eşime teşekkür ederim.

Dr.Cengiz GÖLÇEK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kafa Travmaları.....	4
2.1.1. Primer Beyin Hasarı.....	5
2.1.2. Sekonder Beyin Hasarı.....	5
2.2. Travmaya Bağlı Beyin Hasarının Nörokimyasal Mekanizmaları.....	6
2.2.1. Eksitatuvar Aminoasit Hipotezi.....	6
2.2.2. Oksidatif Stres.....	6
2.2.3. Serbest ve Serbest Olmayan Radikaller.....	7
2.2.3.1. Serbest ve serbest olmayan radikallerin oluşumu.....	7
2.2.3.2. Serbest ve serbest olmayan radikallerin etkileri.....	8
2.2.4. Nitrik Oksit.....	9
2.2.4.1. Nitrik Oksitin Sentezlenmesi.....	9
2.2.4.2. Nitrik Oksitin Etkileri.....	11
2.2.5. Apoptozis.....	11
2.2.5.1. Apoptozisin görüldüğü olaylar.....	12
2.2.5.2. Apoptozisin bozulmasının sonuçları.....	13
2.2.5.3. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları.....	15
2.2.5.3.1. Apoptozisin başlatılması (Sinyal üretimi).....	15
2.2.5.3.2. Hücre içi proteazların aktivasyonu.....	19
2.2.5.3.3. Hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişimler.....	20
2.2.5.4. Apoptozis ve Nekroz.....	22
2.2.5.5. Apoptozis ve Fagositoz.....	23
2.2.5.6. Apoptozis ve Kaspazlar.....	24
2.2.6. Kaspazlar.....	24
2.2.6.1. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması.....	25
2.2.6.2. Kaspazların aktivasyonu.....	27
2.2.6.3. Kaspaz-3' ün apoptozisteki yeri ve önemi.....	29

2.3. Matriks Metalloproteinazlar.....	30
2.3.1. Ekstrasellüler Matriks ve Matriks Metalloproteinazların Önemi.....	30
2.3.2. Matriks Metalloproteinazların Yapısı.....	30
2.3.3. Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması.....	31
2.3.3.1. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9).....	32
2.3.3.2. Matriks Metalloproteinaz 9 (Jelatinaz B).....	33
2.3.4. Matriks Metalloproteinazların Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	34
2.3.5. Matrix Metalloproteinazların Ekspresyon ve Regülasyonu.....	35
2.3.6. Matriks Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri.....	35
2.3.7. Santral Sinir Sistemi ve Metalloproteinazlar.....	36
2.4. Melatonin ve Genel Özellikleri.....	38
2.5. Kafa Travmasında Klinik Tedavi.....	40
2.5.1. Pozisyonlanma.....	41
2.5.2. Solunum Desteği.....	41
2.5.3. Hiperventilasyon.....	41
2.5.4. Sıvı Tedavisi.....	41
2.5.5. Metabolik Fonksiyonların Düzenlenmesi.....	41
2.5.6. BOS Salgılanmasını Azaltıcı Tedavi.....	41
2.5.7. Ozmotik Tedavi.....	41
2.5.7.1. Mannitol.....	41
2.5.7.2. Furosemid.....	42
2.5.8. Sedatif ve Analjezikler.....	42
2.5.9. Paralitik Tedavi.....	42
2.5.10. BOS Tahliyesi.....	42
2.5.11. Barbitürat Tedavisi.....	42
2.5.12. Dekompresif Kraniyektomi	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Anestezi.....	44
3.2. Travma Modeli ve Uygulanması.....	44
3.3. Deney Grupları.....	46
3.4. Sakrifikasyon ve doku örneklerinin alınması.....	47
3.4.1. Sakrifikasyon işlemi.....	47
3.4.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	47
3.4.2.1. Histopatolojik incelemeler.....	47

3.4.2.2. İmmunohistokimyasal incelemeler.....	47
4. BULGULAR.....	50
4.1.İmmunohistokimyasal Bulgular.....	50
4.1.1.Caspase 3.....	51
4.2.2.Caspase 8	53
4.3.3.MMP-9.....	55
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ.....	62
7. ÖZET.....	63
8. SUMMARY.....	64
9. KAYNAKLAR.....	65

TABLÖLAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1: Apoptozisi düzenleyen proteinler.....	19
Tablo 2: Apoptozis ve nekroz arasındaki belirgin farklar.....	23
Tablo 3: Kaspazlar ve diğer isimleri.....	25
Tablo 4: Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması.....	32
Tablo 5: Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler.....	33
Tablo 6: Verilerin dağılımı.....	50
Tablo 7: İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.....	51
Tablo 8: K3 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı	53
Tablo 9: K8 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.....	55
Tablo 10: MMP-9 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.....	57
Şekil 1: Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi.....	9
Şekil 2: Apoptozis mekanizması1.....	20
Şekil 3: Apoptoz ve antiapoptotik mekanizmalar.....	20
Şekil 4: Apoptotik cisimler.....	22
Şekil 5: Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar.....	23
Şekil 6: Kaspazların sınıflandırılması.....	26
Şekil 7: Aktif kaspazın yapısı.....	28
Şekil 8: MMP enzimlerinin moleküler yapısı.....	31
Şekil 9: Hücre yüzeyinde MMP aktivasyon kaskadı.....	34
Şekil 10: MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi.....	35
Şekil 11: Melatoninin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 12: Travma aleti.....	45
Şekil 13: Travma grubunda K 3 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı.....	52
Şekil 14: Travma+ melatonin grubunda K 3 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı.....	52
Şekil 15: Travma grubunda K 8 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı.....	54
Şekil 16: Travma+ melatonin grubunda K 8 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı.....	54
Şekil 17: Travma grubunda MMP-9 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı...	56
Şekil 18: Travma + melatonin grubunda MMP-9.immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı.....	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:	Travma düzeneği.....	45
Resim 2-3:	Kafa travmasının oluşturulması.....	46
Resim 4:	Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki K3 immunoreaktivitesi.....	48
Resim 5:	Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki K8 immunoreaktivitesi.....	48
Resim 6:	Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki MMP-9 immunoreaktivitesi	48

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
CTL	: Sitotoksik T lenfositler
EAA	: Eksitatör Aminoasit
EDRF	: Endotel kaynaklı vazodilatör faktör
ESM	: Ekstraselüler Matriks
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPV	: Human papilloma virüsü
K3	: Kaspaz 3
K8	: Kaspaz 8
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
KİB	: Kafa İçi Basıncı
MDA	: Malonildialdehid
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
NFκB	: Nükleer faktör-B
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂-	: Süperokside Anyonları
OH-	: Hidroksil radikali
PAF	: Platelet Agreve Edici Faktör
PG	: Prostaglandinler
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TIMP	: Spesifik Endojen Doku İnhibitörleri
TNF	: Tümör nekroz edici faktör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, hızlı teknolojik gelişmelere paralel olarak kafa travmaları da hem daha komplike hale gelmekte hem de oran, mortalite ve morbiditeleri hızla yükselmektedir. Kafa travmaları sonrası oluşan beyin hasarı halen önemli bir uluslararası sağlık problemi olmaya devam etmektedir (1,2).

Geleneksel olarak, nekrozun kafa travmasını takiben oluşan beyin hasarının birincil nedeni olduğuna inanılmaktadır. Ama tıp bilimindeki ilerlemeler ışığında kafa travmasına bağlı oluşan beyin hasarının altında yatan patogeneze daha fazla anlaşılmaya başlanmış ve sonuçta travmayı oluşturan güçlerin doğrudan etkisi ile oluşan primer (birincil) hasar ve daha sonra gelişen çeşitli olayların zincirleme reaksiyonları sonucunda ortaya çıkan sekonder (ikincil) hasar kavramları tıp diline girmiştir (3). Ancak tüm bu gelişmelere rağmen sekonder hasarı oluşturan olaylar zincirini başlatan ve devam ettiren mekanizmalar henüz daha açıklanmayı beklemektedir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kafa travması sonrası oluşan travmatik beyin hasarına katkıda bulunan çok sayıda, hücresel, moleküler ve biyokimyasal değişiklikler tespit edilmiştir (4). Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalar, travmatik sekonder beyin hasarının fizyopatolojisine katkıda bulunan çok sayıda moleküler ve patolojik değişikliğin içinde, apoptozu ya da programlı hücre ölümünü ön plana çıkarmaktadır (5,6,7).

Apoptoz çeşitli uyaranlar tarafından başlatılan veya inhibe edilebilen genetik olarak programlanmış aktif yani enerji harcayan bir ölüm programıdır. İskemik stroke, travmatik beyin yaralanması ve epileptik nöbet gibi önemli derecede nöronal hücre ölümüne yol açabilen çeşitli akut olaylarda sekonder hasarın fizyopatolojilerinde önemli derecede rol oynar. Apoptotik hücre ölümü, başlatıcı yollardan herhangi birinin

tetiklenmesi ve bunların uygulayıcı apoptotik yolağı harekete geçirmesi sonucunda oluşur. Yapılan çalışmalar bu yolakların kaspaz-aracılı olan ve olmayan yolaklar diye iki ana grup altında toplanabileceğini göstermiştir (8). Bunların içinde sistein proteazlar ailesinden olan kaspazların birçoğunun özellikle kaspaz 3 (K3) ve kaspaz 8 (K8)'in apoptozis sürecinde önemli başlatıcı veya uygulayıcılar olarak görev yaptıkları birçok çalışmada gösterilmiştir (9). Bu iki kaspaz birçok konuda olduğu gibi travmatik beyin yaralanmasında da çalışılan ve en iyi karakterize edilen iki kaspazdır (5).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), normal gelişim, yara iyileşmesi ve metastatik kanser hücrelerinin yayılması, eklemlerin artritik destrüksiyonu, ateroskleroz ve nöroinflamasyon gibi geniş bir yelpazedeki patolojik süreçlerde önemli olan nötral proteazların bir gen ailesidir (10). Hücre dışı degradasyon enzimleri olan matriks metalloproteinazların aşırı ve uygunsuz ekspresyonlarının birçok patofizyolojik sürece katkıda bulunduğu ve bu durumlarda arttığı (10,11), özellikle MMP-9'un aktive olmasının apoptozis yoluyla nöronal hücre ölümünde uygulayıcı olarak rol aldığını destekleyen bulgular elde edilmiştir (12).

Birçok nöropatolojik olayda olduğu gibi kafa travmasında da sekonder doku hasarını oluşturan olaylar zincirinin en büyük tetikleyicilerinden biri oksidatif stresdir (13). Pineal bezden salgılanan bir indoleamine hormon olan melatonininin güçlü bir antioksidan olduğu ve oksidatif stressi inhibe ederek nöronları koruduğu gösterilmiştir (14)

Biz bu çalışmamızda, oksidatif stresin apoptozis üzerindeki tetikleyici etkisini göstermek ve antioksidan tedavinin apoptoz oluşumuna etkisini araştırmak için deneysel olarak fokal beyin yaralanması oluşturduğumuz ratların bir grubuna antioksidan tedavi olarak melatonin uyguladık ve tüm gruplarda sağlam ve travmalı beyin hemisferlerinde apoptozisin derecesini ve zamansal olarak dağılımını göstermek için kaspaz-aracılı apoptozis göstergeçi olarak bu yolağın merkezinde bulunan K3, tetikleyici olan K8 ve kaspaz-aracılı olmayan apoptozis göstergeçi olarak da MMP-9 seviyelerindeki değişiklikleri araştırdık.

Bu alıřmada:

1- Ratlarda deneysel olarak oluşturulan fokal travmatik beyin yaralanmasında, sağlam ve travmalı beyin hemisferlerinde travma sonrası sekonder yaralanmada etkin rol alan apoptozis ve hücre ölüm mekanizmalarına farklı bir ayrıntı katarak, apoptozisi başlatan, uygulayan ve sürdürenler olması nedeniyle apoptozis gstergeleri olarak sayılan K3, K8 ve MMP-9'un daha önce hiçbir çalışmada yapılmayan şekliyle çeşitli zaman dilimleri içindeki seviyelerine bakarak travmatik sekonder beyin hasarındaki apoptozis derecesinin zamansal dağılımını belirleyebilmek,

2- Ratlara güçlü bir antioksidan olan melatonin vererek melatoninin travmatik sekonder beyin hasarında apoptozisi başlatan oksidatif stresi, dolaylı olarakta apoptozisi azalttığını göstermek ayrıca apoptozis gstergelerindeki (K3, K8 ve MMP-9) düşüş oranlarına göre melatoninin apoptozis sürecindeki etkinliğini ve antiapoptotik özelliğini araştırmak amaçlanmıştır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1.Kafa Travmaları

Çocuklarda ve 45 yaşı altındaki bireylerde önde gelen morbidite ve mortalite nedeni olan travma, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir (2,15).

Kafa travması, kranyumu çevreleyen saçlı deride, kranyumda ve kranyumun çevrelediği yapıların herhangi birinde hasar oluşturan tüm travmaların genel adıdır (15). Travmaya bağlı ölümlerin yarısından çoğunda kafa travması mevcuttur. Trafik kazasında ölen olguların yaklaşık %75'inde beyin hasarına ait bulgular saptanmıştır. Ağır kafa travmalarına bağlı ölüm oranı %35'tir (1,2). Ayrıca ağır kafa travması geçirmiş hastaların ancak %40-50'si tamamen iyileşebilmekte ve kafa travmaları nedeniyle gereken tıbbi bakım, rehabilitasyon maliyeti ve işgücü kaybı oldukça büyük boyutlara ulaşmaktadır (16). Bu nedenle travmaya bağlı hasarı azaltmaya yönelik çalışmalarda prognoz ve ölüm oranı üzerine etki eden faktörleri incelemek ve değerlendirmek büyük önem taşımaktadır.

Son 25 yıl içerisinde yapılan çalışmalar kafa travmaları kaynaklı hasarların tümünün darbe anında oluşmadığını göstermiş, primer hasarlanma ile etkisi sonradan oluşan sekonder hasarlanma arasındaki ayrımı ortaya çıkarmışlardır (17). Buna bağlı olarak son zamanlarda yapılan deneysel ve klinik çalışmaların önemli bir bölümü sekonder hasarın anlaşılmasına ve önlenmesine odaklanmış ve bu alanda kaydedilen gelişmeler klinik tedavinin yönlendirilmesinde büyük katkı sağlamıştır (18).

2.1.1.Primer Beyin Hasarları

Primer beyin hasarı travmadan hemen sonra ve travmanın doğrudan sonucu olarak ortaya çıkan patolojik süreçlere denir. Travma anında ve travmanın direkt etkisi sonucunda oluştuklarından dolayı önlenemezler. Bu hasarlar beyin dokusunun, beyindeki vasküler yapıların ve kafatası kemiklerinin mekanik olarak distorsiyonu ile başlar. Oluşan hasarın tipi bu mekanik distorsiyonun lokalizasyonu ve şiddeti ile belirlenir. Buna göre travma fokal ya da diffüz olabilir. Kontüzyonlar ve intrakraniyal primer fokal beyin hasarı yapan lezyonların önde gelen örnekleridirler. Konküzyo serbri ve diffüz aksonal yaralanma ise diffüz beyin hasarlarının örnekleridir.

Serebral konküzyon ve diffüz aksonal yaralanmalar; Rotasyonal akselerasyon ve deselasyon hareketlerine bağlı ya aksonların zorlanması sonucunda oluşan geçici fonksiyon kaybıyla ya da aksonların yırtılmalarıyla birlikte olan uzun süreli koma şeklinde ortaya çıkan bu iki yaralanma türü, bozulmuş şuurluluk ve koma kliniksel sürecinin her iki ucundaki tablolardır. Aksonların zorlanması sonucunda oluşan serebral konküzyonda, şuurun geçici (<10 dk) bir kaybı olmaktadır. Bu tablo bir retrograd ve posttravmatik (anterograd) amnezi dönemi ile birlikte dir. Beynin beyaz cevherinde oluşan geniş kapsamlı jeneralize bir harabiyetin olduğu, hastada herhangi bir intrakraniyal yer kaplayan lezyon ya da artmış kafa içi basıncı olmadan travmatik koma ile sonuçlanır. Başlangıç CT'si %50-80 oranında normaldir. CT'deki karakteristik bulgular, korpus kallozum ve beyin sapında ve gri-beyaz cevher bileşim bölgesinde küçük peteşiel kanamalardır (19).

2.1.2.Sekonder Beyin Hasarı

Sekonder hasar, primer hasarın başlattığı kompleks hücresel inflamatuvar, nörokimyasal ve metabolik süreçlerin sonucunda ortaya çıkar ve gecikmiş doku hasarı ve hücre ölümüne katkıda bulunan karmaşık bir biyokimyasal olaylar kaskadını içerir (20). Kapsamlı deneysel ve klinik araştırmalar nedeniyle, travmatik beyin hasarının patofizyolojisi konusundaki bilgiler son yıllarda oldukça artmıştır. Bu çalışmalarda sekonder beyin hasarında nöronal hasara yol açan yolaklar arasında glutamate eksitotoksitesisi, Ca^{2+} aşırı yüklenmesi, ve oksidatif stress gibi yolaklar ön plana çıkmıştır (21).

Geçmişte, travmatik kafa travması sonucunda gelişen nöronal ve glial hücre kaybın, genellikle inflamatuvar hücrelerin ortaya çıkması ile birlikte olan nekrozun bir sonucu olarak kabul edilmekteydi. Ancak bu konudaki araştırmalar travmatik sekonder

beyin hasarı sonrası merkezi sinir sistemindeki hücre dejenerasyonu kaskadında apoptozun daha önemli bir rol oynadığını göstermiştir (22).

2.2.Travmaya Bağlı Sekonder Beyin Hasarının Nörokimyasal Mekanizmaları

2.2.1.Eksitatör Aminoasit Hipotezi (Glutamate eksitotoksitesi ve Ca^{2+} aşırı yüklenmesi)

Eksitatör aminoasit hipotezinin (EAA) en büyük varsayımı; çok sayıda nörotransmitterlerin salınımının içinde travmanın da bulunduğu değişik yaralanmalarda aşırı salınımı ve birikimi ile kesintisiz hücre hasarı başlattığı, Ca^{2+} 'un hücre içine girerek hücre ölümüne yol açacağı esasına dayanır (23). EAA'ler üzerinde en çok çalışılanlar, memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleri olan Glutamat ve Aspartat'tır. Bunlar sinaptik geçişin yönlendirilmesi ve nöron içine iyon geçişinin kontrolünde rol oynarlar. Bu aminoasitler, eksitatör iletiden sorumlu oldukları halde belli koşullarda paradoksal olarak, nörotoksitenin de potansiyel kaynağıdır (24). Travma, iske mi, epilepsi ve benzeri patolojik süreçler sırasında EAA salınımı ve buna bağlı olarak öncelikle AMPA ve Kainat reseptör kanalları yoluyla Na^+ hücre içine girer, hücrede şişme ortaya çıkar. İkinci aşama hücre içine normalin üzerinde Ca^{2+} girişidir ki, bu NMDA reseptör aşırı uyarılmasına yol açar. Bu da potansiyel olarak nörotoksik olan birçok olaylar serisinin ortaya çıkmasına yol açar. Hücre içindeki Ca^{2+} artışı lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik (Calpain I ve diğer Ca^{2+} bağımlı proteazlar) enzimleri aktive edecektir. Proteolitik enzimlerle hücre zarı ve iskeletini oluşturan yapılar yıkılırken, lipolitik enzimler ise nöron membranındaki fosfolipidleri parçalarlar. Bu olay kısır bir olay olan araşidonik asit (AA) döngüsünü başlatır. AA enzimler aracılığı ile okside olur ve prostoglandinler (PG); PGE2, PGD1, PGF1, PGF2, PGG2, prostasiklin, lökotrienler ve değişik hidroksi türevlerine dönüşür. Bu süreci takiben oluşan serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu hasar ilerler ve nöronun ölümü ile sonuçlanır. Yani glutamate eksitotoksitesi ve Ca^{2+} aşırı yüklenmesi sonucu oluşan nörotoksitenin son yolağında yine oksidatif stres tir (24).

2.2.2. Oksidatif Stres

Oksijen insanın hayatta kalması için hayati bir bileşendir. Oksijen doğada istikrarlı bir üçlü radikal (3O_2) olarak bulunur. Solunduğunda, aşamalı bir indirgeme işleminden geçirilir ve sonuçta su ile metabolize edilir. Bu süreçte, küçük bir miktar

süperoksit anyon radikalleri (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH), nitrik oksit (NO) gibi reaktif araçlar ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekli oksijen (1O_2) gibi, serbest olmayan radikal türleri oluşturulur. Bu reaktif araçlara topluca reaktif oksijen türleri (ROT) veya reaktif nitrojen türleri (RNT) denir. ROT ve RNT'ler serbest radikal reaksiyonlar oluşturarak moleküler destrüksiyonlara yol açabilirler. H_2O_2 , 1O_2 ve tekli oksijen (ozon) serbest radikaller değildir ama canlı organizmada kolayca serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler. İnsan organizması ROT ve RNT ile indüklenen oksidatif strese yani oksijenin toksisitesine karşı kendisini korumak için etkili bir savunma sistemine ve enzimatik sistemlere sahiptir. Bu antioksidan sistem olarak adlandırılır. Ancak, bu antioksidan sistem muhtemelen reaktif oksijen (ROT) ve nitrojen türlerinin (RNS) aşırı üretiminin olduğu patolojik durumlarda yetersiz kalabilir ve bu durum oksidatif stress olarak adlandırılır (25,26).

2.2.3. Serbest ve Serbest Olmayan Radikaller

2.2.3.1. Serbest ve serbest olmayan radikallerin oluşumu

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya birden fazla elektron içeren molekül veya molekül parçalarıdır. Bir atom veya molekül, bir elektron vererek (oksidasyon) veya alarak (indirgenme) serbest radikal haline gelebilir (27). Biyolojik sistemler; normal koşullarda içerdikleri O_2 'nin büyük bölümünü tetravalan olarak indirgerler. Bu işlem için mitokondrilerdeki sitokrom oksidaz benzeri sistemleri kullanırlar. Normal koşullar içerisinde nadiren kullanılan, ancak bazı patolojik olaylarda artan univalan indirgeme ile değişik reaktivitelere sahip serbest radikaller oluşur. Bir, iki veya üç elektronun O_2 ile reaksiyona girmesi sonucu sırasıyla; süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH-) meydana gelir. H_2O_2 serbest radikal değildir ancak hidroksil radikaline dönüşür. Lipid, protein ve DNA molekülleri ile reaksiyona giren hidroksil radikali ise oldukça toksik bir yapıya sahiptir (28).

Bu indirgenme mitokondrial solunum zincirinin ilk basamağında oluşur. Ekstramitokondrial reaksiyonlarda ise hipoksantin ve ksantin, ksantin oksidaz tarafından ürik aside okside edildikleri reaksiyonda serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaksiyon iskemi ve yeniden kanlanma esnasında serbest radikallerin başlıca oluşum şeklidir. Çünkü iskemi esnasında hipoksantin ve ksantin birikimi olmakta ve Ca^{2+} yükselmesi de ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren proteazları aktive etmektedir (29).

2.2.3.2.Serbest ve serbest olmayan radikallerin etkileri

Hidroksil radikali son derece toksik bir yapıdır ve komşu lipid, protein ve DNA molekülleri ile reaksiyona girer. Hidroksil radikali, oksijen radikali ve H_2O_2 nin oluşturduğu kimyasal reaksiyonda oluşur. Bu reaksiyona “Haber-Weiss reaksiyonu” adı verilmektedir. Bu reaksiyon doğal durumda çok yavaş olurken demir tarafından katalize edildiğinde hızlanmakta ve böylece hidroksil radikali oluşumu hızla artmaktadır (28). Normal şartlar altında taşıyıcı proteinlerine (ferritin ve transferrin) sıkı şekilde bağlı olan Fe^{3+} , oksijen radikali varlığında ferritinden, asidoz varlığında da transferrinden ayrılır (28,29). Serbest radikaller kimyasal olarak güçlü reaktif moleküllerdir. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa serbest radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyonu başlatırlar.

Serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir;

- 1-Lipidlerin peroksidasyonu ile hücre zarının geçirgenliği bozulur,
- 2-Oluşan serbest radikaller çevrelerindeki zincirleme reaksiyonun yayılmasıyla daha uzaklardaki biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar oluşturur. Reaksiyona girdikleri biyolojik moleküller arasında, plazma membranı, hücre organellerinde bulunan doymamış yağ asitleri, çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve çeşitli sentez ve genetik kod aktarımını yöneten nükleik asitler yer alır (28,29).

Travmatik beyin yaralanması sonrası, serbest radikal hasarı oldukça önemlidir. Büyük lipid içeriği ve yüksek oranda oksidatif metabolizması nedeniyle beyin, oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hücresel destrüksiyon için iyi bir hedeftir. Araşidonik asit metabolizması, kalsiyum tarafından uyarılma ile mitokondriden salınma, katekolaminlerin otooksidasyonu, damar dışına çıkma, hemoglobinin yıkılması ve ksantin oksidaz aktivasyonu gibi çeşitli yollarla oluşabilir. Araşidonik asit döngüsü travmatik yaralanmayı takiben serbest radikallerin oluşmasında en önemli yoldur. Özellikle, EAA salınımına bağlı olarak kalsiyum açığa çıkması sonucunda zararlı proteaz ve lipazların artışı olur (fosfolipaz A2, lipooksijenaz ve siklooksijenaz). Bu enzimler tromboksan A2, prostoglandin, lokotrien ve serbest yağ asitlerinden araşidonik asit oluşturur. Bu ürünlerin yıkılmasındaki döngüde serbest oksijen radikalleri üretilir. Hipoksantin-ksantin yolu kafa travmasını takiben serbest radikal kaynağı olarak ikinci önemli yoldur. EAA döngüsü ile tetiklenir, kalsiyum tarafından aktive edilen proteoliz ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çevirir, sonuçta hipoksantin ksantine

oksidasyonu gerçekleştirilir ve ürik asitle birlikte aynı zamanda oksijen radikalleri oluşur (28,29).

Serbest radikallerin oluşturduğu patolojik süreç; lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasına yol açar. Bu süreç sonucunda oluşan zincirleme reaksiyonlar ile hücrenin organelleri içerisinde bulunan doymamış yağ asitleri, bazı proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerde hasar görürler (29).

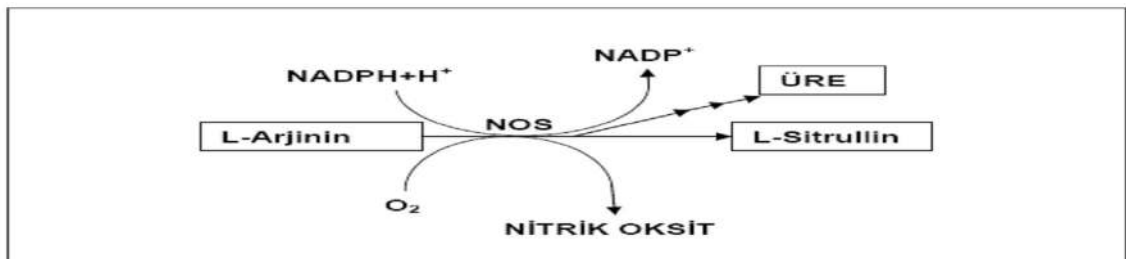
Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer. Peroksidasyon, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest O_2 radikallerinin hücrenin diğer bileşenlerine etkisi ile vasküler geçirgenlikte artma, enflamasyon, ödem, kemotaksis ile sekonder hücre hasarına yol açar. Lipid peroksidasyon son ürün olarak malonildialdehid (MDA) meydana getirir. MDA hücre zarından kolayca geçer ve hücre içinde Schiff bazlarıyla birleşerek, lipofuksin şeklinde sitoplazma içinde toplanır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar, MDA'nın genotoksik ve mutajenik etkileri olduğunu ortaya koymuştur (29).

2.2.4. Nitrik Oksit

Birçok biyolojik ve patolojik olayda önemli rolü olan Nitrik oksit (NO), en az 3 NOS izoenzimi: nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS), ve endotelial (eNOS) izoformları tarafından L-arginine'den sentezlenir ve yarı ömrü çok kısa olan bir serbest radikaldir. (30).

2.2.4.1. Nitrik Oksitin Sentezlenmesi:

NO, omurgalılarda sitokrom P-450 redüktazın homologu olan NOS yardımıyla L-arginininden sentezlenir. Son görüşlere göre NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, L-arginine girerek NO ve sitrülün üretmektedir (30) (Şekil.1)



Şekil 1: Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi

NOS izoenzimleri: Temel olarak 2 ana grupta incelenir:

A.Yapısal (constitutive) NOS (cNOS): Ayırıcı özelliği, aktivitesinin Ca^{+2} 'a bağımlı olmasıdır. Özellikle damar ve endotel hücreleri (31), ürogenital sistem dokuları (32), santral ve periferik sinir sistemi nöronları (30), adrenal korteks ve medulla hücreleri (33), trombositler, uterus ve barsak interstisyumunda bulunmaktadır (34,35). cNOS'un iki izoformu mevcuttur: nNOS ve eNOS. cNOS ve izoenzimlerinin başlıca bulundukları yerler ve etkileri farklıdır.

1-nNOS kaynaklı NO: Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tespit edilmiştir.

Merkezi sinir sistemi: Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük ağırlıklı nörotransmitterdir. Presinaptik salgılanan glutamatın etkisiyle postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'ı aktive edilir ve oluşan NO ile hedeflenen etkisini oluşturur. Ayrıca sinapsların şekillenmesinde, koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde rol alır (36,37).

Periferik sinir sistemi: Nonadrenerjik ve nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar. Solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastrointestinal sistem motilitesinde, mesane sfinkter işlevinde ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol oynar (38,39,40,41).

2-eNOS kaynaklı NO: Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder (42). Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir. Trombositlerin adhezyonunu ve agregasyonunu inhibe eder (35).

B.Uyarılabilir (inducible) NOS (iNOS): İlk olarak endotoksinler ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu izoform aktivite için Ca^{+2} 'a bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. iNOS başta makrofajlar olmak üzere polimorfonükleer lökositler, hepatositler, damar düz kasları, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından üretilir (43,44). Enzim induklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle nonspesifik immünitede önemli rol oynar. Patolojik durumlarda oksidatif stressin en önemli kaynaklarından biridir

2.2.4.2. Nitrik Oksitin Etkileri

cNOS ile üretilen NO normal fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için gereklidir. iNOS ile üretilen yüksek konsantrasyonlar ise hasarı artırır. Sepsis ve inflamasyonda iNOS enziminin tetiklenmesi sonucunda NO üretimi artar. Travma durumunda ise ekstrahepatik arginaz ekspresyonu ve aktivasyonu artarken NO sentezinde arginaz ve NOS enzimleri arginini substrat olarak kullanırlar. Arginaz ekspresyonu arttığında hücre içinde ornitin ve poliamin konsantrasyonları artarken endotel hücrelerde bazal NO sentezi azalır. Endotelden salınan NOS ile sentezlenen NO, damarların gevşemesi, platelet agregasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek, travma sonrasında organlarda kan akımının sürdürülmesini sağlar (34). Travma modelinde yapılan bir çalışmada sıçanlarda artan ekstrahepatik arginaz ekspresyonu ve aktivitesinin, plazma nitrat-nitrit konsantrasyonlarının kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir (45). Ratlarda laparotomi modelinde yapılan çalışmalarda operasyonu takiben damar içine L-argininin uygulamasının splanknik kan akımını ve kalp atım hızını artırdığı bildirilmiştir (46,47). Benzer bir çalışmada da abdominal laparotomi sırasında bazal düzeyde sentezlenen NO'nin akut dönemde mikrovasküler bütünlüğün sağlanması için önemli olduğu gösterilmiştir (48).

2.2.5. Apoptozis

Apoptozis, eski Yunanca *apo* (ayrı) ve *ptosis* (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terketmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack' ın önerisiyle "*apoptoz*" olarak adlandırılmıştır (49).

Apoptozis terimi, bilimsel olarak ilk defa İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (50).

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak artık gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan genetik olarak kontrol edilen bir olaydır. Ayrıca bu olayın gelişmekte olan omurgalı ve omurgasız canlıların yanı sıra bitkilerde de meydana geldiği görülmüştür (51).

Embriyonik dönemden başlamak suretiyle tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma mevcuttur. Bazı hücreler yıllarca yaşarken, bazıları ise sadece birkaç saat yaşarlar. Örneğin; bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (52). İlk önceleri hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmese de bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı ve fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (51).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir. Apoptozis, mitozisden 20 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Mitozis (yapım) ve apoptozis (yıkım) dokuda sürekli bir denge halindedir. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmıştır. Bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Görüldüğü gibi apoptozis mekanizması, organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen, hızlanmış veya tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı süreçlere örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara ise otoimmün hastalıklar ve kanser örnek olarak gösterilebilir (53,54,55).

2.2.5.1. Apoptozisin görüldüğü olaylar

Apoptotik hücreler organizmanın bazı hücre ve dokularında sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir (53).

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

A. Fizyolojik olaylar

1. Embriyogenez ve fütogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apoptozise gitmektedir. El ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalıyken parmaklar arasındaki hücreler apoptoz ile yıkılarak parmaklar ayrılır (53)
2. İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler, timusta olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ortadan kaldırılır (53).

3. Sinir sisteminde sinapsların oluşumu sırasında bazı nöronlar apoptozisle ortamdan uzaklaştırılır (56).
4. İnce bağırsaklardaki kriptaların tabanlarında oluşan yeni hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve bu göç sonunda ölürek bağırsak boşluğuna dökülürler (53).
5. Derinin keratinositleri, derinin bazal tabakasında oluştuktan sonra derinin üst tabakasına doğru göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etmenlerden koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere apoptozise giderler (53).
6. Erişkinlerde hormon yetersizliğine bağlı olarak oluşan organların işlevlerinin azalmasında apoptozis rol oynamaktadır. Örnek olarak laktasyon sonrası meme bezlerinde gerileme ve menapozda ovaryum foliküllerinin atrezisi (dejenerasyonu) verilebilir (51).
7. Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölürlere ve menstruasyon kanı ile uzaklaştırılırlar böylece uterusun iç tabakası olan endometrium apoptozis ile dökülerek uzaklaştırılır (53).
8. Yaşlılıkta apoptozis izlenmektedir (57).

B. Patolojik olaylar

1. Virüslerle enfekte olmuş veya kalıcı DNA hasarı olmuş hücreler, sıklıkla apoptozis yoluyla kendilerini öldürürler. Eğer bu hücreler, apoptozise gidemezse ileride kanser gelişimine neden olabilirler (58).
2. Tümörlerde hem büyüme hem de gerileme aşamasında hücre ölümü gözlenmektedir (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi) (52).
3. Çeşitli zedeleyici etkenlere (ısı, radyasyon, antikanser ilaçları, hipoksi vb.) bağlı olarak hücre ölümü oluşmaktadır (59).

2.2.5.2. Apoptozisin bozulmasının sonuçları

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının pek çok hastalığın oluşumunda etkin rol oynadığı gösterilmiştir.

Azalma

Malignite (Kanser): Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz hücre artışının olduğu hastalıklar olarak bilinmektedir. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle malign hücrelere dönüşürler. Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engeller. Bu şekilde

davranan iki tip Human papilloma virüsünün (HPV) serviks kanseri (rahim ağzı kanseri) oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan p53' e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder. Bazı kanser türlerinde ise apoptozisin aktive olmasını sağlayan proteinleri etkileyerek apoptozis oluşumunu engellerler (lenfoma). Kanser hücreleri virüsler olmadan da apoptozisi engelleyebilir (B hücre lösemisi). Akciğer kanserinde ise p53 geni mutasyona uğramış veya kayıp olduğu pekçok hastada gözlenmiştir (60).

Otoimmünite: Virüsler hücreleri enfekte ettiklerinde girdikleri hücreye kendi proteinlerini sentezletirken o hücrenin kendisi için gerekli olan proteinlerinin yapımını durdururlar. Bu yüzden o hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür (hepatit virüsleri vb.) (54).

Artma

Nörodejeneratif hastalıklar: Nöronlar, sinaptik bağlantılar uygun şekilde kurulduktan sonra bir daha bölünemeyen yani çoğalamayan hücrelerdir. Dolayısıyla yenilenemediklerinden ömür boyu yaşarlar. Oysa Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi hastalıklarda apoptozis süreci tetiklenerek nöronların öldüğü bilinmektedir (61,55).

İskemi-Reperfüzyon hasarı: Çeşitli yaralanmalar sonucu farklı dokularda meydana gelen hasarlarla dokulara yeterli besin sağlanamayabilir. Bu durumda hücreler apoptozise gider ve hasar devam ettikçe apoptozisin hızı artar ve hücre geri dönüşümsüz bir yola girer (58).

AIDS: AIDS' in en önemli belirtisi CD4 T-hücrelerinin (lenfosit) kanda çok düşük seviyelere inmesidir. Bu düşüşe hasta etkin immün cevap veremez ve hücre ölümü gözlenir (54).

Toksik Nedenli Karaciğer Hasarı: Vücuda alınan toksik maddelerin detoksifikasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. Bu toksik maddeler apoptozisin başlamasını tetikleyerek hücre ölümünü hızlandırır (62).

İnsüline Bağımlı Tip Diyabet: Bu hastalıkta insülin salgılayan hücreler apoptozisle ölmektedir (51).

Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar **apoptozis** ve **nekroz**' dur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir.

2.2.5.3. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları

Apoptozis hücrenin içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer.

I) Apoptozisin başlatılması

II) Hücre içi proteazların aktivasyonu

III) Hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişimler

IV) Fagositoz

2.2.5.3.1 Apoptozisin başlatılması (Sinyal üretimi)

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek hücre içi veya hücre dışı bir sinyale ihtiyaç vardır (52).

Hücre Dışı Sinyaller

a) Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği

b) Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu

- FAS-FAS Ligand aracılığıyla gerçekleşen apoptozis

- TNF aracılığıyla gerçekleşen apoptozis

c) Sitotoksik T lenfosit aracılığıyla gerçekleşen apoptozis

d) Dış etmenler (iskemi, toksinler, radyasyon)

Hücre İçi Sinyaller

a) DNA hasarı

b) Hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) düzeyi artışı

c) Hücre içi pH artışı

d) Metabolik veya hücre siklus bozuklukları

Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller

a) Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler çevre hücrelerden ve ekstraselüler matriksden gelen yaşam sinyallerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler. Örneğin nöronlar sinir büyüme faktörü (NGF) yetersizliğinde apoptozis gösterebilirler. Çevreden gelen sinyallerin kesilmesi ile hücre ölümü başlamaktadır. Büyüme faktörlerine bağımlı hücre kültürlerinde büyüme faktörleri çekildiği zaman hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklama olduğu gözlenmiştir (sitokin, büyüme hormonları) (52).

b) Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu: Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozisde rol alan membran proteinleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör

reseptörü (TNFR) ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptozis ile sınırlı değildir. Bir kısmı apoptozis oluştururken bir kısmı proliferasyona (hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması) neden olur. Bir kısmı da her ikisinde görev alır. TNFR içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1` dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları “adaptör proteinlere” bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara bağlanırlar (prokaspaz 8) (63).

1- Fas-Fas Ligand aracılığıyla gerçekleşen apoptozis:

Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü olan Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde olan parçası Fas adaptör proteinle (FADD-Fas adaptör protein with a death domain) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (death inducing signal complex-DISC) oluşturur. Bu olay da prokaspaz 8` in aktifleşmesini sağlar. Fas Ligand membrana bağlı veya çözülebilir olabilir. Çözülebilir Fas ligand (FasL, CD95L) immün sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörlere bağlanmasıyla, immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apoptozisle yok edilmeleri sağlanmış olur (63).

2- TNF (tumor necrosis factor) aracılığıyla gerçekleşen apoptozis:

Bir sitokin olan TNF` nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD- TNFR ) ile etkileşir. TRADD (adaptör protein ölüm bölgesi) daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8` i aktifleştirerek apoptozise yol açar. Fas reseptörünün aksine TNFR1` in TRADD` la etkileşmesi her zaman apoptozisle sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-B (NFkB) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun seçildiği açık değildir. Ancak hücrede aktif NFkB (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir (63,64).

c) Sitotoksik T lenfosit aracılığıyla gerçekleşen apoptozis: Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL` lerin ana görevi malign veya virüs ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir. Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL` ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen apoptozis oluşmasını sağlayan proteinler içeren

sitoplazmik granüllere sahiptirler. Perforin, transmembran por oluşturuucu proteindir. CTL' ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak granzim B salgırlarlar. Granzim B hedef hücrelere giderek kaspazları aktive eder (49,52,63).

d) Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler: Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptozise neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirirler (58).

Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller

a) DNA hasarı: Hücrede herhangi bir nedenle (radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı oluştuğunda eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusu G1 fazında durdurulur ve hücreye DNA' sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir (60). Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geninin insan tümörlerinde %80 mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücrenin siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenmiş olur. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse hücre siklusundaki blok kalkar (60). Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerinden, pro-apoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (58,60).

b) Hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) düzeyi artışı: Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Sitoplazmadaki Ca^{++} iyonu miktarındaki hafif artış c-myc, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. cAMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi cAMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı gözlenmiştir. Ca^{++} ' dan bağımsız olarak da apoptozisin gerçekleşebileceği gösterilmiştir. Sitoplazmada artan Ca^{++} , inaktif durumdaki Ca^{++} bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarının oluşmasına neden olur (65).

Kalsiyum iyonları hücre içinde eşit oranda dağılmamıştır. Endoplazmik retikulum içinde sitoplazmadan daha fazla Ca^{++} iyonu mevcuttur. Endoplazmik retikulumda yüksek Ca^{++} iyonu olmasını sağlayan ve sitoplazmadan Ca^{++} taşıyan

Ca⁺⁺-ATPaz pompasının inhibe edilmesi durumunda, sitoplazmada Ca⁺⁺ yoğunluğunun artması ile hücrenin apoptozise gittiği gözlenmiştir (51,52).

Endoplazmik retikulum aracılığıyla gerçekleşen apoptozis mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılığıyla gerçekleşen apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar Ca⁺⁺ seviyelerinin ve kalpainin ER' u etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7' nin salınımı ile prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı olduğu bulunmuştur. Aktifleşmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir, kaspaz-9 ile aktifleşerek kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in-vitro ve in-vivo olarak kaspaz-12' nin kaspaz-9' u aktive ettiğini göstermiştir. Ca⁺⁺ iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi gizli enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur (65).

Kalsiyuma bağlı endonükleazlar: Endonükleazlar sitoplazmada artan Ca⁺⁺ tarafından aktif hale getirilir. DNA zinciri, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayrılır (65).

Transglutamazlar: Apoptozisde hücreler büzülür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar, transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir (52).

Proteazlar: Proteazlar histonları ve kromatin yapısını düzenleyen proteinleri parçalarlar. Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan “kalpin” hücrenin iskelet yapısını bozar. Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir (52).

Lipid modifiye edici enzimler: Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır (Membran fosfolipidlerinin hücre içi ve dışında kalan kısımları farklıdır). Bu asimetri ATP' ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır. Apoptotik süreç oluştuğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algılar ve fagosite ederler (52).

Protein kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz-A apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (52).

2.2.5.3.2 Hücre içi proteazların aktivasyonu

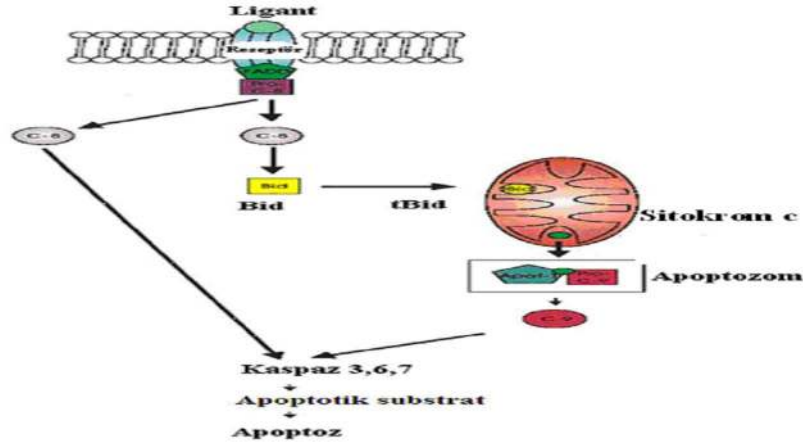
İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara “*kaspaz*” adı verilir. Kaspazlar başlatıcı, sonlandırıcı ve inflamasyonda rol alanlar olmak üzere üç gruba ayrılır (66). Memeli hücrelerinde 15 çeşit kaspaz tespit edilmiştir (67). Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla başlatıcı kaspazları, aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler (66). İç sinyallerle oluşan apoptozisde mitokondri önemli rol oynar. Mitokondrinin aktivasyonu apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır ki bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir (66,68). Bcl-2 ailesi birbirine zıt iki gruptan oluşur. Bu gruptaki proteinlerin bir kısmı anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) bir kısmı pro-apoptotiktir (apoptozisi tetikleyici) (Tablo 1.). Bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom-c’ nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozisin başlaması) ya da sitokrom-c’ nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) (66,68).

Apoptozisi baskılayan (Anti-apoptotik) proteinler	Apoptozisi uyaran (Pro-apoptotik) proteinler
bcl-2 bcl-xl bcl-w bfl-1 brag-1 mcl-1 Rb	bad bax bak bcl-xS bid bik Hrk 1 c-myc p53 p21 c-Fos,c-Jun

Tablo 1: Apoptozisi düzenleyen proteinler

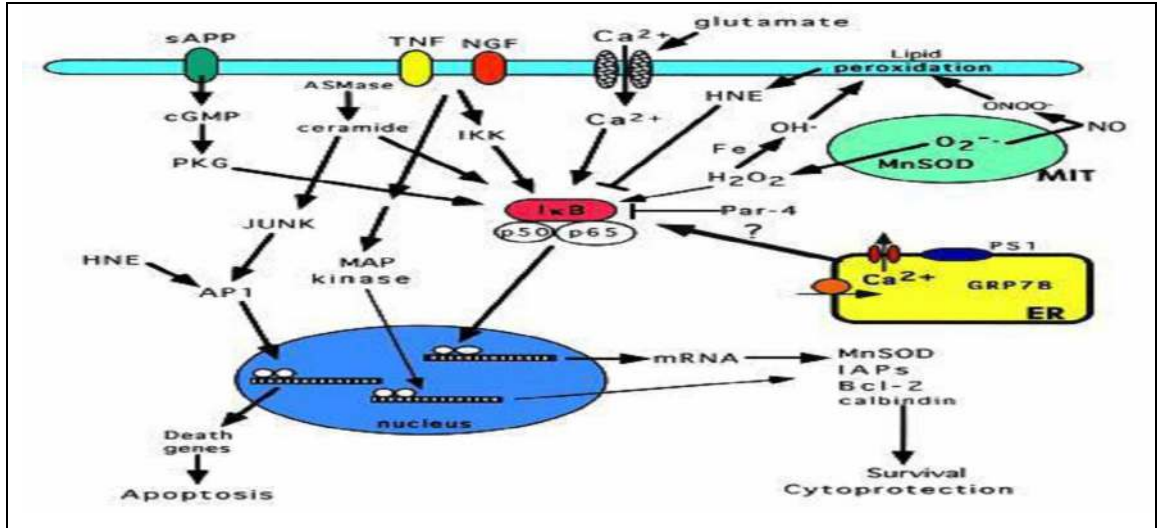
Bcl-2 proteini anti-apoptotiktir ve mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör1 (Apaf 1)’ e tutunmuştur. Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumunda serbest hale geçen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder (69). Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller Apaf-1’ in mitokondriden ayrılmasına neden olur, bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Bu geçirgenlik artışı, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom-c’ nin sitozole çıkmasına yol açar. Sitokrom-c’ nin sitoplazmada Apaf-1, kaspaz-9 ve ATP ile

birleşmesi ile oluşan yapıya “apoptozom” denir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3’ ü aktive ederek apoptozise neden olur (Şekil 2-3.) (70).



Şekil 2. Apoptozis mekanizması

Bir hücrede hücre içi bcl-2/bax oranı hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax fazla ise hücre apoptozise gidecektir, bcl-2 fazla ise apoptozis inhibe olacaktır. İnsanda bcl-2 ailesine üye 23 gen tanımlanmıştır. Bu sayede dokuya spesifik ilaçların üretimi mümkün olacaktır (68).



Şekil 3. Apoptoz ve antiapoptotik mekanizmalar

2.2.5.3.3. Hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişimler

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kalkmakta ve böylece denge sağlanmaktadır (71).

Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar (71).

1. Hücre iskeletinin yıkılması:

Kaspazlar, aktive olmasıyla hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteinin aktif hale gelmesini sağlar. Böylece hücre normal şeklini kaybeder. Hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüslerin diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (71).

2. DNA kırıklarının oluşturulması:

Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{++} - Mg^{++} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur (142,144). Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılmalar oluşur (65).

3. Hücre membran değişiklikleri:

Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Sağlıklı hücrelerde plazma zarının iç yüzünde bulunan *fosfatidilserin* yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Bu değişim fagositik hücreler için sinyal görevi görür. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar (66).

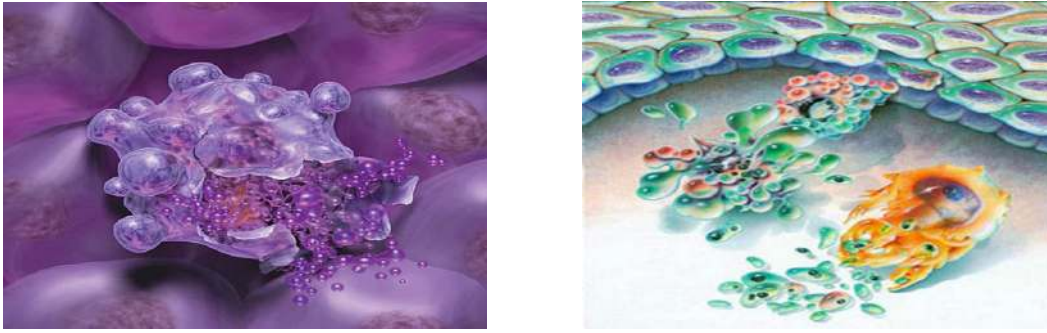
Morfolojik değişiklikler

Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Böylece hücreler su kaybederek küçülüp, büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller ise genelde sağlamdır, bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel olarak yerleşmiş olan mikroflament kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Genişleyen sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluştururlar ancak mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (71).

Morfolojik olarak en önemli değişiklikler nükleusta izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çöker. Elektron mikroskopundaki incelemede kromatinin yoğun granüler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği gözlenir. Çekirdekte hücre gibi

büzüşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (49).

Apoptoz hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopunda da izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı çekirdekli olarak görünür. Çekirdek kromatininin, çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarım ay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeler ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan “*apoptotik cisimler*” meydana gelir (Şekil 4) (71).



Şekil 4: Apoptotik cisimler

2.2.5.4. Apoptozis ve Nekroz

Nekroz, hücre şişmesi ve parçalanması ile karakterize, ani ağır iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir (72). Bu tür hücre ölümünde hücre içi denetim mekanizmalarının bir etkisi yoktur.

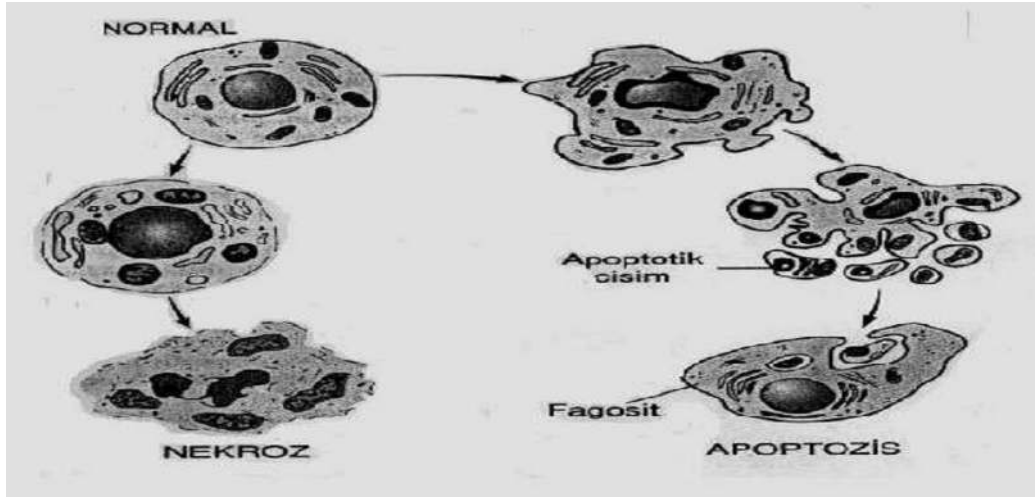
Nekroz “hücre katili” olarak da adlandırılmaktadır ve mitokondriyal şişme, karyolizis, plazma membranının yırtılması ve sitoplazmik içeriğin dışarı salınması ile karakterizedir. Nekroz sonucu dokuda inflamatuvar reaksiyon oluşur (72).

Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeler çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz, yüksek ATP seviyeleri apoptozis için gerekli olur. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (73). Apoptozis hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçası gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları tablo 2 ve şekil 5. de gösterilmiştir.

Apoptozis (İntihar)	Nekroz (Katletme)
Kontrollü ölüm	KontROLSÜZ ölüm
İç ve dış sinyallerle başlar.	Dış etkenlerle başlar. (iskemi, toksin, radyasyon)
Enerji gerektirir.	Enerji gerektirmez.
Tek hücre etkilenir.	Hücre topluluklarını etkiler.
Hücre büzüşür, fagosit olur.	Hücre şişer, patlar ve içeriğini çevreye boşaltır (Na,su girişi).
Fizyolojik bir olaydır.	Patolojik bir olaydır.
İnflamatuvar yanıt oluşmaz.	Belirgin bir inflamasyon vardır. (ağrı, kızarıklık, kabarıklık, yara izi vb)

Tablo 2: Apoptozis ve nekroz arasındaki belirgin farklar



Şekil 5: Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

2.2.5.5. Apoptozis ve Fagositoz

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptozisde ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır (73). Apoptozis sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler. Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar.

Apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından tanınması, normalde hücre zarının iç membranda yer alan fosfatidilserinin apoptotik mekanizmayla birlikte hücre zarının dış kısmına çıkmasıyla olur. Ayrıca bu olayda fibronektin benzeri bir serum proteini olan

ve doku hücrelerinin birbirine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinen vitronektin reseptörünün rol oynadığı belirlenmiştir. Apoptotik cisimlerin makrofajlarca tanınmasında rol oynayan diğer reseptörler; trombospondin reseptörleri olan α vB ve CD-36 ile Fas reseptörüdür.

Trombospondin, trombositler tarafından sentezlenen ve hücre içi granüllerde depolanan bir glikoprotein olup, trombosit bağlanmasında otokrin büyüme düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Trombospondine trombosit dışında epitelyum hücrelerinin ekstraselüler matrikslerinde, düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda da rastlamak mümkündür. Fakat bu hücrelerdeki fonksiyonu bilinmemektedir. Fas, tümör nekroz edici faktör (TNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) ile yapısal benzerlik gösteren bir hücre yüzeyi proteini olup, apoptozisin başlamasında rol oynar. Apoptotik hücrenin tanınmasında lektinin de rolü olabilir. Bilindiği üzere lektin, hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat yapısındaki reseptörlere bağlanabilen bir proteindir (52).

Apoptozisde izlenen hücre zar değişiklikleri, apoptotik hücre zarındaki bu moleküller aracılığı ile makrofajlara ve çevre hücrelere iletilerek hücrenin fagositozuna yol açar (73).

2.2.5.6.Apoptozis ve Kaspazlar

Kaspazlar apoptozisde önemli bir yer teşkil ederler. Apoptozis gelişim sırasında ve normal hücresel homeostazisin sağlanmasında aktif rol oynar. Bir sistein proteaz olan kaspazlar apoptozisin iç veya dış sinyallerle (DNA hasarı, UV vb.) uyarılması sonucu aktifleşerek hücreyi geri dönüşümsüz bir yola sokarlar. Bu süreçte kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bu mekanizma hücre ölümü esnasında (fizyolojik veya orta şiddette zedelenme sonrası) yüksek oranda korunmakta ve zarar görmemektedir (74).

Kaspazların apoptozise olan katkıları iyi planlanmış bir askeri operasyonu andırmaktadır. 15 çeşit olan kaspazlar apoptozisin farklı aşamalarında görev almaktadırlar. Kaspazların herhangi bir inhibitör (FLIP, CrmA) tarafından aktiviteleri engellenmediği sürece hücre ölümünde aktif rol oynarlar (74).

2.2.6.Kaspazlar

Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinirler. Kaspazlar (Cystein-containing **AS**partate **Prote**ASEs) sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptit bağımlıdır (75). Merkezlerinde sistein yer aldığı için sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Şu ana kadar 15

tanisi tanımlanmış olup farklı isimlerle de adlandırılmaktadırlar (Tablo 3). 12 tanesi insanda tespit edilmiştir (67). Hücrede zimojen (inaktif) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirirler. Hücrede düşük konsantrasyonlarda monomer halinde bulunurlar (75). Kaspaz-15 yeni belirlenmiş bir enzim olup, sadece plesantali memelilerden domuz ve köpekte tanımlanmıştır. İnsanda ve sıçanda bu enzim bulunmamaktadır (67). Kaspazlar apoptozisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptozisin her üç yolunda da aktif olarak rol alırlar (66).

☐ Kaspaz-1 (ICE) ☐ Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2) ☐ Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama) ☐ Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICEren) ☐ Kaspaz-5 (ICErlıı, TY) ☐ Kaspaz-6 (Mch2) ☐ Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1) ☐ Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH) ☐ Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)	☐ Kaspaz-10 (Mch4) ☐ Kaspaz-11 (I CH-3) ☐ Kaspaz-12 ☐ Kaspaz-13 (ERICE) ☐ Kaspaz-14 (MICE) ☐ Kaspaz-15
--	---

Tablo 3: Kaspazlar ve diğer isimleri

2.2.6.1. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması

Kaynağına ya da ölüm uyarana bakılmaksızın apoptozise giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi gözlenmiştir. Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans'* in genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır. CED-3, CED-4 ve CED-9 genleri *Caenorhabditis Elegans'* daki apoptozu düzenlemekte olup memelilerde de bu genlerin homologlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Memelilerdeki karşılığı ise ICE (interleukin-1 beta dönüştürücü enzim) ya da diğer ismiyle kaspaz-1' dir. Her ne kadar kaspaz-1 hücre ölümüyle açık bir ilişkiye sahip olmasada, ilk önce tanımlanan bu geniş ailenin bir üyesidir (74).

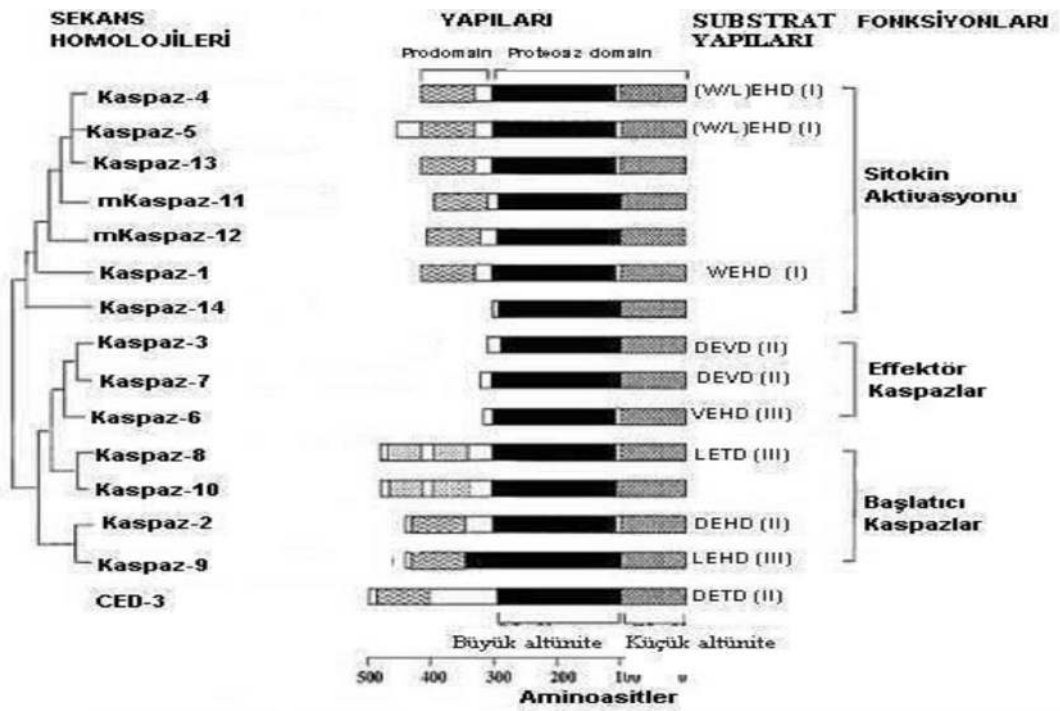
Bcl-2, Apaf-1 ve kaspaz proteaz ailesi, CED-3, CED-4 ve CED-9' un memelilerdeki analogları olarak tanımlanmıştır. Kaspaz ailesi CED-3' ün, Bcl-2 ailesi ise CED-9' un homologudur (66).

Kaspazlar benzer aminoasit dizilimine sahiptirler, yapısal ve substrat spesifikliğide benzer özellikleri paylaşırlar. Tüm kaspazlar proenzimler şeklinde üretilirler. Bu durumda kaspazlar 3 kısımdan meydana gelir (30-50 kD). Bunlar; **NH2 terminal kısım** (sub-2), **geniş altünite** (20 kDa veya p20) ve **küçük altünite** (10 kDa veya p10)' dir. Terminal kısım yüksek değişkenlik gösteren bir dizilime sahiptir ve

uzundur, aktivasyonun düzenlenmesini içerir. Diğer iki kısım ise tüm kaspazlarda benzer özellikler gösterir (75).

Proteolitik süreç içinde aktivasyona uğrayan kısımlar arasında yani geniş ve küçük subunitler arasında heterodimer oluşturacak şekilde birleşmeler oluşur. Bazı prokaspazların yapısında iki alt üniteyi birbirinden ayıran 10 aminoasitlik bağlayıcı bölgelerin varlığı tespit edilmiştir (75).

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana gruba ayrılırlar (Şekil 6) (74).



Şekil 6: Kaspazların sınıflandırılması

1- Başlatıcı kaspazlar (apoptozisi başlatanlar): Kaspaz 2, 8, 9, 10' nu içermektedir. Uzun prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar pro-apoptotik sinyalleri alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Herbiri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran proteinleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler. Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz-2' nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD (p53 uyarıcı protein) ve adaptör protein olarak RAIDD (RIP ile ilgili protein) olması gerekir (60).

2- Efektör kaspazlar (apoptozisi yürütenler): Kaspaz 3, 6, 7' yi içermektedir. Kısa prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (74).

3- Sitokinleri aktive eden kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14' ü içermektedir. Hücre sinyali iletiminde önemli role sahip olan sitokinlerin aktivasyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (74).

Kaspaz 14' ün dışında tüm inflamatuvar ve başlangıç kaspazları uzun bir subunit sahiptir. Uzun subunit “Ölüm oluşturan bölge (DED)” veya “Kaspazı aktive eden bölge (CARD)” yi kapsar. Bu alanlar prokaspazlar arasında protein-protein aracılı etkileşime neden olur ve prokaspazların aktivasyonunun da önemli rol oynar. Karşıt olarak efektör kaspazların kısa subunitleri arasında benzer bir etkileşim beklenmez (75).

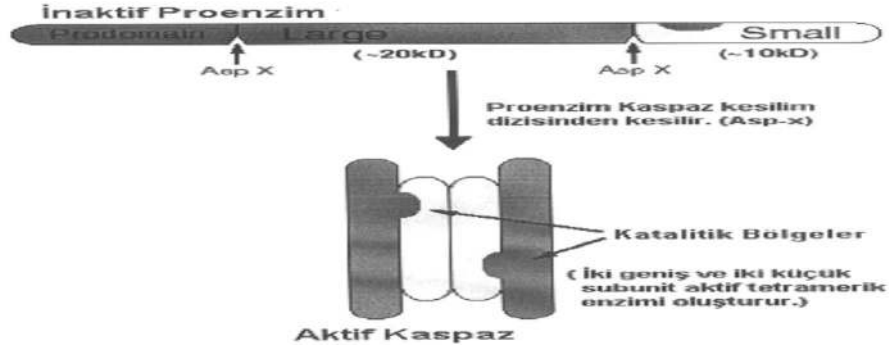
Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizisi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir. Kaspaz-1 ve -3' ün kristal yapısı incelendiğinde her ikisinin de, iki heterodimer yapının birleşerek tetramer yapıyı oluşturduğu görülmektedir (75).

2.2.6.2. Kaspazların aktivasyonu

Hücre ölümü özel bir mekanizma (kaspaz kaskadı) ile oluşmaktadır. Bu mekanizma hücre ölümü esnasında yüksek oranda korunmakta, zarar görmemekte ve sürekliliği sağlanmaktadır. Bu değişim tekrarlı ve sıralı olup 30-60 dk. içerisinde tamamlanmaktadır (75).

Kaspazların en az 3 yolla aktive edildiği belirlenmiştir. Bunlar; otoaktivasyon, transaktivasyon, non-kaspaz proteazları ile proteolizdir (75).

Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptirler. Prokaspazlar hücrede çok fazla sentezlenirler ve yapay olarak çapraz bağlarla aktive olabilirler. Prokaspazların aktivasyonu için özel bir şekilde kesilmeleri gerekmektedir. Aktif hale gelmeleri yine başka bir kaspazın ilgili prokaspazı aspartik asitin bulunduğu özel bölgeden kesmesi ile olur. Aktive olmaları ile bu aktif kaspazlar başka prokaspazları keser ve onları da aktive ederler (Şekil 7) (76).



Şekil 7: Aktif kaspazın yapısı

Başlatıcı kaspazların aktivasyonu için spesifik kofaktörlerin bağlanması gerekir, bu durum proteazlarda sık görülen bir mekanizmadır. Bu bağlanma pro-apoptotik sinyali tetikler ve en azından farklı iki yapısal faktör rol alır. Bu kaspazın prodomain kısmı ve onun karşılığı olan kofaktörüdür. Prokaspaz-8' in aktivasyonu için onun onun kofaktörü FADD (Fas Associated protein with death domain)' den DED (death effector domain)' e kadar uzanır. Prokaspaz- 9 aktivasyonu için APAF-1 kofaktörü ile kompleks yapar (76). APAF-1' in indüksiyonu ise sitokrom-c' nin mitokondriden saliverilmesi ile olur. Apaf-1' in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3' ü aktifleştirir (74).

Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direk proteolizdir (76). Örneğin, sitotoksik T hücre proteazı olan granzim-B, bir aspartatspesifik serin proteazı olan prokaspaz -3 ve 7' nin etkin bir aktivatörüdür.

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspazların bir rolüde yaşayan hücreleri apoptozdan koruyan proteinleri inaktive etmektir. Kaspazlar önce hücrelerin etrafı ile olan ilişkilerini kesmekte, sonra hücre iskeletini yeniden organize etmektedirler. En son olarak da DNA replikasyonunu ve tamirini sonlandırmaktadırlar. Böylece DNA tahrip edilip çekirdek yapısı bozulur. Fagositoz için gerekli hücre sinyallerinin üretilip açığa çıkması sağlanır ve son olarak apoptotik cisimcikler hücrede bozulmaya yol açar (74).

Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu ile apoptozis gerçekleşmektedir (71). Örneğin periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne K3'e

ne de K9'a gereksinim duyarlar. Oysa embriyonik kök hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyarlar (77).

2.2.6.3. K3' ün apoptozisteki yeri ve önemi

Kaspazların apoptozise olan katkıları son derece belirgindir. Kaspazlar, iskemi aracılığıyla gerçekleşen hücre ölümünde rol oynayan aspartata özel sistein proteaz ailesindendirler. Kaspazlar iskemi sonrasında ve genetik kontrolle aktive olurlar (78). Nöronal apoptoziste önemli bir yer teşkil ederler. Geçici iskeminin in-vivo modellerinde kaspazları inhibe eden ajanlar yaralanmayı azaltmada oldukça etkilidir. Kaspaz 1 ve K3 iskemide başlayan hücre ölümü kaskadının en önemli düzenleyici enzimleridir. Sinir sistemi yaralanmalarında görülen apoptoziste en önemli rol K3' e aittir (77). Chen vd. K3' ün gecikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini rapor etmişler ve K3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz 1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (78).

Apoptozisin dış ve iç sinyallere bağlı olmak üzere iki yolu mevcuttur. Apoptozisin en önemli fazı K3 aktivasyonudur. Diğer kaspazlar gibi K3' te prokaspaz olarak sentez edilir. Nöronlarda apoptotik hücre ölümü kaskadında aktif forma dönerler. K3, K6, 8, 9 ve 10 birlikte aktive edilir. K3' de K 6 ve 7' yi aktive eder (79).

Apoptozisin efektör fazında önemli bir rol oynayan K3' ün aktivitesinin engellenmesi nörolojik defektlere yol açar (79). Deneysel iskemi ve travmatik beyin yaralanması sonucunda nöronal hücre ölümüne K3 aktivitesi katkıda bulunur. Bu iki yaralanmada da kaspaz inhibitörleri (QVD-OPH) apoptozisi azaltmakla kalmayıp ayrıca hayvanlarda fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmıştır (72).

Spinal kord yaralanmasında, kaspaz bağımlı apoptozis oldukça iyi açıklanmıştır. Son çalışmalarda K8, K9 ve K3' ün spinal kord yaralanmalarında meydana gelen apoptozisteki önemli rolleri vurgulanmış, K3' ün efektör kaspaz olduğu gösterilmiştir (80). Apoptotik süreçte K3' ün en önemli rolü üstlendiği ve K9' un da K3' e benzer özellikler gösterdiği de yine son çalışmalarla desteklenmektedir (80).

DNA fragmentasyonunda, DNAaz aktivasyonuna sebep olan kaspaz-3' ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. K3 geninin kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Bu gen embriyonik dönemin 4. gününden itibaren gelişimden sorumludur. K3' deki eksiklik ciddi nörolojik gelişim problemlerine hatta 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir (80).

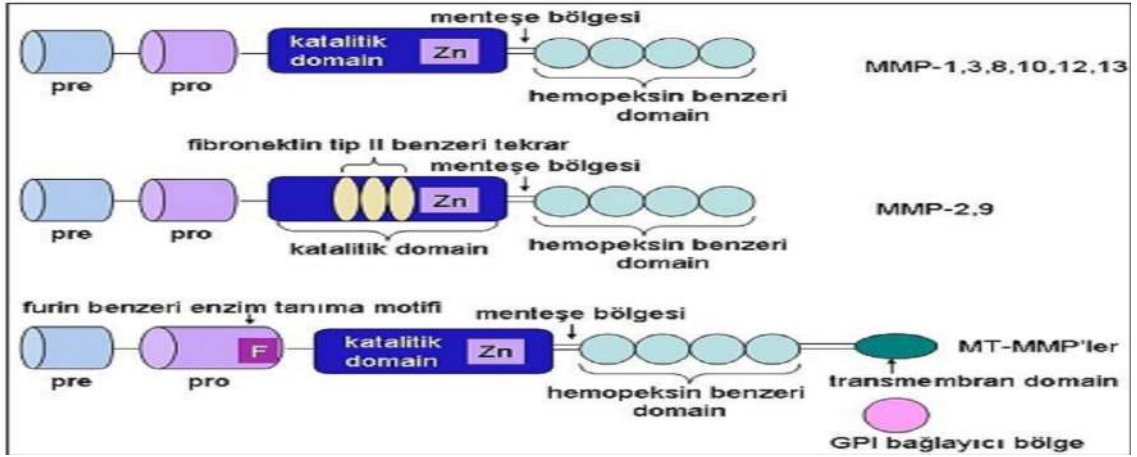
2.3.Matriks Metalloproteinazlar

2.3.1. Ekstrasellüler Matriks ve Matriks Metalloproteinazların Önemi

Matriks Metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratan çinko ve kalsiyum bağımlı nötral endopeptidazlardır. Ekstrasellüler matriks (ESM), hücreler arası boşlukta özel bir ortam oluşturan dinamik, interaktif bir yapıdır (81). Dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcı olur. Bunun yanı sıra hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için rezervuar görevi yapar. Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile direk ya da indirek olarak etkileşmesini sağlar (82). Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşmeler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik rol oynar (81). Hücre ve matriks etkileşmeleri ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar (82). Bu enzim sistemlerinin içinde MMP'lar önemli bir grubu oluşturmaktadır. MMP'ların diğer isimleri matriksinlerdir (83). Türlerine göre endotel hücreleri, fibroblast, trombositler, T lenfositler, kondrositler, epitel hücreleri, nötrofiller gibi oldukça çeşitli hücrelerden eksprese edilirler (83). Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP) arasında sürekli bir denge söz konusudur (84). MMP'lar ve TIMP'lar normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında kemiğin yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, embriyogenezis, anjiogenez, inflamasyon, apoptozis, immun cevap gelişimi sayılabilir. Ayrıca kanser, amfizem, astım, fibrotik akciğer hastalığı, ateroskleroz gibi patolojik olaylarda da rol alırlar (83).

2.3.2. Matriks Metalloproteinazların Yapısı

MMP'lar bazı ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lar predomain, prodomain, katalitik domain, menteşe bölgesi, hemopeksin/vitronektin benzeri domain bölümlerini içerirler (85) (Şekil 8).



Şekil 8: MMP enzimlerinin moleküler yapısı

1. Pre-domain bölgesi: MMP'ların tümü tipik olarak N terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domain içerirler (85). 80 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir. Molekülü sekresyon için hedefleyen ve latent enzimde bulunmayan peptid dizesidir (83).
2. Pro-domain bölgesi: Enzimin latent formda kalmasından sorumludur (83).
3. Katalitik domain: 170 aminoasit içerir. Çinko bağlayan bölgedir. Ek olarak yapısal çinko ve kalsiyum iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir. Jelatinaz enzimleri bu bölümde 3 tane fibronektin tip II benzeri ilave bir domain bulundurlar. Bu kısım jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi artırır, ayrıca elastolitik aktivite için de temeldir (83).
4. Mentşe bölgesi: Prolinden zengin olup, katalitik domaini hemopeksin benzeri domaine bağlar. MMP-7 ve MMP-26'da bulunmaz (83).
5. Hemopeksin benzeri domain: 200 aminoasit içerir. MMP-7 ve MMP-26 hariç tüm MMP'larda bulunur. Bu bölge "hem" bağlayan bir peptiddir. Ayrıca endojen doku inhibitörlerinin, jelatinaz grubu MMP'lara ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir (86)

Bu yapısal özelliklere ek olarak MT-MMP'lar, MMP-11, MMP-23, MMP-28 prodomain ile katalitik domain arasında yer alan "fürin benzeri enzim tanıma motifi" içerirler. Bu kısım enzimin hücre içi fürin benzeri proteazlar tarafından tanınmasını sağlar. MT MMP'lar salgılanma öncesi bu motifi tanıyan proteazlarla aktive edilirler (85)

2.3.3. Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması

Günümüze kadar 24 çeşit MMP tanımlanmıştır. MMP'lar substrat spesifitesine göre 6 ana grupta sınıflandırılır (83) (Tablo 4).

Tablo 4: Matriks metalloproteinazların sınıflandırılması

ENZİM	MMP
Kollajenazlar İnterstisyel kollajenaz(kollajenaz 1) Nötrofil kollajenaz(kollajenaz 2) Kollajenaz 3 Kollajenaz 4	MMP-1 MMP-8 MMP-13 MMP-18
Jelatinazlar Jelatinaz A Jelatinaz B	MMP-2 MMP-9
Stromelisinler Stromelisin 1 Stromelisin 2	MMP-3 MMP-10
Matrisilinler Matrisilin 1 Matrisilin 2 Stromelisin 3	MMP-7 MMP-26 MMP-11
Membran tipi MMPs (A) Transmembran tip MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP (B) GPI anchored MT4-MMP MT6-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24 MMP-17 MMP-25
Diğerleri Makrofaj elastaz Enamelisin CA-MMP Epilisin	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28

2.3.3.1. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9)

Jelatinaz enzimleri, diğer MMP’lardan farklı olarak katalitik bölgede 3 tane fibronektin tip II benzeri ilave bir domain bulundurlar. Bu kısım jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi artırır, ayrıca elastolitik aktivite için de temeldir. Jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel protein, fibronektin, fibrillin-1 gibi proteinleri yıkma özelliğine sahiptirler (87). Diğer MMP’lar gibi inaktif proformlar olarak salınırlar ve ekstrasellüler olarak aktive edilirler. α 2 makroglobulin ve TIMP’lar aracılığıyla inhibe ederler. Bu enzimler epitelial tümörlerin lokal yayılımına neden olur. Jelatinazlar, ESM yıkımı, angiogenez, doku remodeling ve hücre migrasyonu süreçlerinde önemli rol oynarlar. Ayrıca birçok sitokin ve kemokin üzerinde etkileri

vardır. MMP-9, IL-8'i parçalayarak daha potent IL-8 ortaya çıkmasını sağlar (88). Yine TNF- α , TGF- β ve IL-1 β 'yı inaktif formdan aktif forma dönüştürür (89,90). MMP-9, VEGF'ün salınımını arttırarak anjiogeneze rol alır. VEGF de MMP-2'nin endotel hücrelerinden salınımını arttırarak bazal membran yıkımına yol açar ve yeni damar oluşumuna neden olur (88).

2.3.3.2 Matriks Metalloproteinaz 9 (Jelatinaz B)

Jelatinaz B olarak da adlandırılır. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır. MMP-9, akciğer dokusunda infeksiyon veya inflamatuvar hastalıklar sırasında uyarılan bronş epitel hücreleri, *clara* hücreleri, alveolar tip II hücreleri, fibroblast, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinden üretilir. Lökosit, lenfosit, eosinofil, makrofaj, NK hücreleri, dentritik hücreler ve mast hücreleri tarafından da üretilir (91). Ayrıca primer ve sekonder akciğer kanser hücreleri de MMP-9 için kaynaktır (92). MMP-9, jelatin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir. Ayrıca MMP-9 Tip III, Tip V kollajen, elastin ve fibronektini parçalar (93). Kolorektal, mesane, mide kanserinde ve derinin yassı hücreli karsinomlarında makrofajlarda saptanmıştır. MMP-9' un akciğer kanserinde birçok çalışmada tümör hücrelerinde ve serumda arttığı gösterilmiş ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (94).

Son çalışmalarda, önemli hücre dışı degradasyon enzimleri olan matriks metalloproteinazların ekspresyonlarının bir çok patofizyolojik durumda arttığı ve özellikle MMP-9'un hücre ölümüne sebep oldukları gösterilmiştir (10). Bir çalışmada ayrıca, MMP-9'un aktive olmasının apoptozis yoluyla nöronal hücre ölümünü indükleyebildiği de gösterilmiştir (12). MMP-9, TIMP-1,-3,-4 ve $\alpha 2$ makroglobulin tarafından inhibe edilir. Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler Tablo 5'de gösterilmiştir (88,93).

Tablo 5: Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler (93).

Aktive edici faktörler			İnhibe edici Faktörler
Hücre yüzeyinde etkili Faktörler	Kimyasal ajanlar	Diğerleri	
Kalsiyum iyonofor A23187 Konkanavalin A Kristaller Ürat Hidroksiapatit Kalsiyum pirofosfat İntegrin reseptör antikor Polihidroksietilmethakrilat Fagositoz	C-AMP Kolsişin Lipopolisakkarit Mitomisin C Pentoksifilin Forbol diesterleri Prostaglandin E Trifluoperazin UV ışını	Viral transformasyon Onkogenler Otokrin ajanlar Fibroblastların yaşlanması İnterlökin 1 Epidermal büyüme faktörü Platelet büyüme faktörü TNF	Retinoik asit Glukokortikoidler Östrojen Progesteron Adenovirüs-5EIA geni

2.3.4. Matriks Metalloproteinazların Aktivitesinin Düzenlenmesi

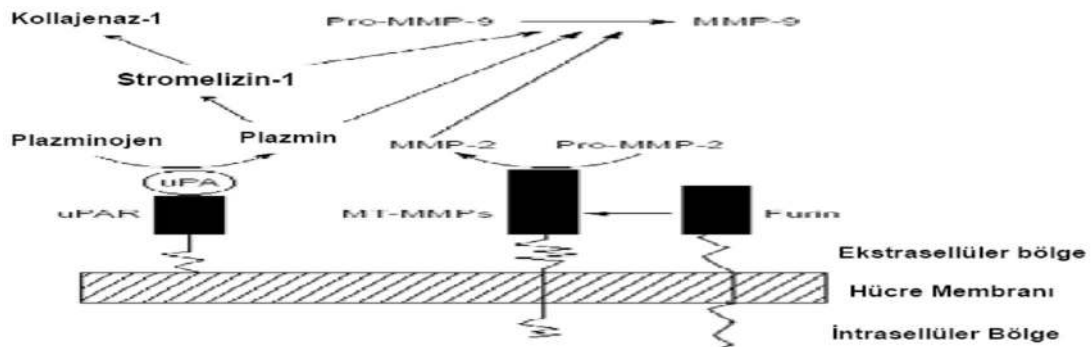
Fürin tarafından aktif hale getirilen birkaç üyenin dışında MMP'ların tümü inaktif zimojenler olarak salınırlar. MMP'ların matriks degradasyonu yapabilmesi için proteolitik kırılma ile aktif forma dönüşmesi gerekir. Üç farklı aktivasyon mekanizması tanımlanmıştır (94).

1. Aşamalı aktivasyon
2. Mt-MMP'lar ile hücre yüzeyinde aktivasyon
3. İntrasellüler aktivasyon

ProMMP olarak salınan enzimler; SH reaktif ajanlar, civalı bileşikler, reaktif oksijen ve denatüranları gibi nonproteolitik ajanlar ve proteinazlar tarafından invitro aktive edilirler. Tüm durumlarda Cyn-Zn (*sistein swich*) etkileşiminin kesilmesi gereklidir ve bu aktivasyon aşamalı aktivasyon olarak adlandırılır. Aşamalı aktivasyon esnasında ilk adım plazmin, tripsin, elastaz ve kallikrein gibi bir proteinaz ve diğer MMP'lar ile gerçekleşir. Bu proteinazların invivo ortamda çoğu potent patolojik aktivatörleri plazmin yoluyla olur. Ayrıca aktive olan MMP'lar da diğer proMMP'ları aktive edebilir. Membran bağımlı MT-MMP'lar hücre yüzeyinde proMMP-2 enzimlerini aktive edebilir. Hücre yüzeyinde MMP aktivasyon kaskadı Şekil 9'de gösterilmiştir (95).

Plazmin, MMP'nin propeptit domaininin plazminojene hassas bölgesine atak yapar. Propeptitte konformasyonel bir değişiklik meydana gelir ve ikinci bir proteinaz ile hızla kırılarak aktive edilir. MMP'ın hücre yüzeyinde aktivasyonu, hücre migrasyonu esnasında ESM'in degradasyonunda önemlidir. Membranda bulunan MT1-MMP ile MMP-2'nin aktivasyonu bu olaya örnektir (86).

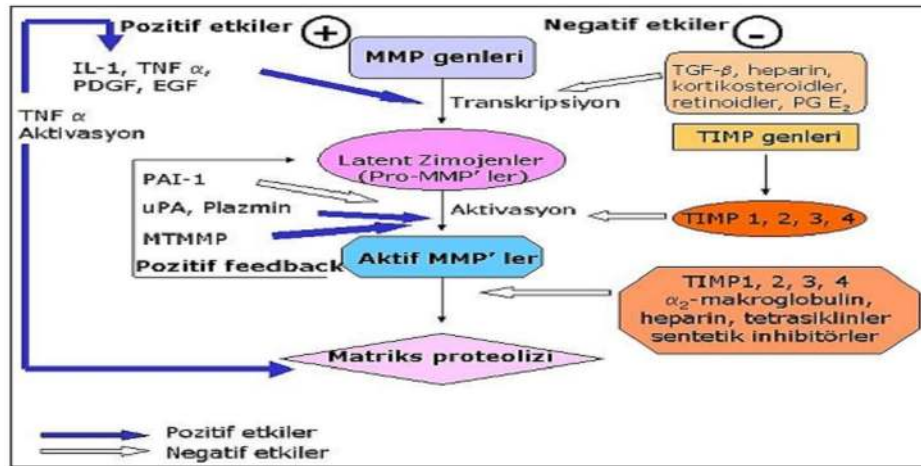
Bazı MMP'lar intrasellüler olarak aktive olurlar. MMP-11'in (stromelizin) golgi ile ilişkili subtulisin benzeri proteinaz tarafından aktivasyonu buna örnektir.



Şekil 9: Hücre yüzeyinde MMP aktivasyon kaskadı (95).

2.3.5. Matrix Metalloproteinazların Ekspresyonu ve Regülasyonu

Normal yetişkin dokularında MMP'lerin ekspresyonu düşük düzeyde bulunur. Bazı fizyolojik ve patolojik *remodeling* olaylarında ekspresyonları daha üst aşamada düzenlenir. MMP fonksiyonları hem gen aktivasyonu hem de protein aktivasyonu aşamalarında düzenlenir. MMP'ların transkripsiyonel regülasyonu, proksimal promoter bölgelerinde yer alan AP-1 düzenleyici eleman ile sağlanır. MMP gen transkripsiyonu sitokinler (IL1-4), büyüme faktörleri (EGF, TGF- α , TGF- β 1, TNF27 α , Basic fibroblast growth faktör), hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile uyarılabilir. Bu aktivatörlerin reseptöre bağlanması ile en az 3 değişik sınıf mitojen aktive edilmiş kinazlar (MAP) tarafından sağlanan intrasellüler olaylar zinciri ile hücresel AP-1 transkripsiyon faktörü aktif hale geçirilir ve AP-1 cis elementine bağlanarak MMP geninin transkripsiyonunu sağlar (96). MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi Şekil 10'de gösterilmiştir



Şekil 10. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (95)

2.3.6. Matriks Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri anahtar rol oynar. Bunun yanı sıra α 2 makroglobulin, heparin, tetrasiklinler, C reaktif protein ve sentetik inhibitörler aktif MMP inhibisyonu yaparlar (97)

Matriks Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri (TIMP'lar) bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel proteinlerdir(97). Endotel hücresi, vasküler kas hücresi, makrofajlar, kan hücreleri ve bağ dokusu hücrelerinden salınırlar. Günümüzde TIMP-1,-2,-3,-4 olmak üzere tanımlanmış 4 TIMP türü vardır. TIMP'lar, MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini kontrol altında tutarlar. MMP'lara geridönüşümsüz ve nonkovalent bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve

katalitik aktivitenin sürdürülmesini inhibe ederler (84). EGF, TGF- β , IL-1 β , IL-6, retinoik asit, onkostatin, forbol esterleri, FGF gibi ajanlarla TIMP'ların aktivitesi artar. Konkonovalin, deksametazon ile inhibe olur. Yine TNF- α 'nın düşük konsantrasyonlarında TIMP-1 üretimi artar, yüksek konsantrasyonlarında üretimi baskılanır (98). TIMP'lar, MMP enzim aktivitesini inhibe etme yönünde benzerlik göstermekle beraber matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonu düzenlenmesi açısından aralarında farklar vardır (84).

Aktif MMP inhibitörlerinden biri de α 2 makroglobulindir. Yüksek molekül ağırlığı nedeniyle bağlandığı MMP'nin molekül ağırlığını artırıp hareket yeteneğini kısıtlar (83).

Tetrasiklin analogları MMP molekülünün çinko içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açarlar ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar (83).

Son yıllarda peptid ve nonpeptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri üretilmiştir. Bu inhibitörler en çok kanser, kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde denenmiştir (99).

2.3.7.Santral Sinir Sistemi ve Metalloproteinazlar

Metalloproteinazlar bazı istisnalar dışında santral sinir sisteminde oldukça düşük seviyelerde bulunurlar. MMP-2 beyinde genel olarak damarların etrafında bulunur ve yapısal olarak denatüre olmuş şekildedir. MMP-9 ise normal beyin dokusunda gösterilememiştir. MMP-7 ise normal beyin ekstraselüler matriksinde birçok substratın yıkımını sağlar ve idareci görevini üstlenmiştir. Birçok santral sinir sistemi hastalıklarında MMP'ların artışı gösterilmiştir. Multiple sklerozda BOS da normalde bulunmayan MMP-9 artışı ve immun modülatör tedaviyle düzenlenişindeki azalma çalışmalarla gösterilmiştir (100). Bütün MMP üyeleri çeşitli kanser türleriyle ilişkilidir. Malign beyin tümörlerinin invazyonuna birkaç MMPs aracılık etmektedirler. Glioma hücrelerinin in vitro koşullarda MMP-1, MMP-2, MMP-3 salgıladıkları ve glioblastoma beyin ekstraktları ve metastatik akciğer lezyonlarında MMP-9 artışı olduğu tespit edilmiştir. Glioma tedavisinde MMP inhibitörlerinin geliştirilmesi umut vaat etmiştir (101). Ayrıca MMP'ların; inme, viral enfeksiyonlar, Alzheimer hastalığı, inflamatuvar myopatiler, amiotrofik lateral sklerozisin fizyopatolojisinde katkıları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (102,103,104).

MMP'lar, sinir sistemi içerisindeki normal ve patolojik fonksiyonlarla anılmaktadır. Örneğin, MMP'lar, hücre migrasyonu, nörit büyümesi ve

miyelinasyonunu düzenlemesi olası nöronal gelişimde önemli roller üstlenirler. MMP'lar, pek çok SSS patolojisine eşlik eden nöroenflamatuvar süreçlerde çoğalma ve düzenlemede kritik öneme sahiptir (10). Örnek olarak, belli bazı MMP'lar myelini indirgeyebilir, amiloid prekürsör proteini ayırabilir ve viral nörotoksisiteyi artırabilir. Sonuç olarak MMP'ların multipl skleroz(MS), Alzheimer hastalığı ve insan immün yetmezlik hastalığı (HIV), demans patojenezinde doğrudan rolü olduğu gösterilmiştir. Özellikle MMP-9 MS ve diğer nöroinflamatuvar hastalığı olanlarda daha yüksek bulunmuştur (102,103,105).

MMP ekspresyon seviyeleri, bir yetişkin beyinde genel olarak oldukça düşüktür ya da tespit edilemez. Bununla birlikte, pek çok MMP çeşitli uyarıcılara tepki olarak artabilir. Nöronlar, astrositler, oligodendrositler, mikroglial ve endotelial hücrelerin hepsi hasar sonrasında MMP ve TIMP üretebilirler, ancak beyin bölgeleri, MMP/TIMP türleri ve hücrel ekspresyon kaynakları belirli yaralanma tiplerine göre farklılık göstermektedir. Nötrofiller, bir MMP-9 kaynağıdır (106,107).

Ayrıca nöroinflamasyon ve MMP arasındaki ilişkileri ortaya koymak için bir dizi çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda; sitokinler ve serbest radikalleri içeren nöroinflamasyon, deneysel olarak hayvan beyinlerine lipopolisakkarid ya da TNF- α 'ın enjeksiyonu yapılarak gösterilmiştir. Fare beyine TNF- α enjeksiyonu ile 24 saat sonra MMP-9 üretiminin indüklendiği, aynı zamanda kan beyin bariyerinin (KBB) bozulduğu ve MMP inhibitörünün (Batimastat, BB-94) kullanılması ile KBB açılmasının bloke edildiği gösterilmiştir (108). Benzer olarak, lipopolisakkarid enjeksiyonundan 8 saat sonra KBB'nin açıldığı ve aynı zamanda MMP-9'un üretildiği gösterilmiş diğer bir MMP inhibitörü (BB-1101) ile KBB'nin açılması ise bloke edilmiştir. Lipopolisakkarid enjekte edilmiş beyinlerin immünohistokimyasal çalışmalarında enjeksiyon bölgelerinde MMP-3 ve MMP-9 üretimi gösterilmiştir (109).

Kan beyin bariyerinin bozulması ile sonuçlanan yolu etkileyen birçok faktör vardır. Birçok çalışma da plasminojen/plasmin sisteminin ve MMP'lerin etkisini vurgulamaktadır. ProMMP'lerin aktivasyonu, proteolitik prosesin gerçekleşmesinde mekanizmaları iyi anlaşılmamış oldukça kritik bir basamaktır. Hücre kültürlerinde mikrogliallar proMMP'leri aktive etmek üzere perisit, endotel hücreleri ve astrositler ile ilişki içine girer. ProMMP'lerin aktivasyonu için mikrogliallar gereklidir. İskemik olaylarda TNF-alfa, IL-1 β gibi inflamatuvar mediatörlerin salınımı MMP'ların üretimini artırır. Plasminojen/plasmin sistemi TIMP-2'nin varlığında pro- MMP'nin aktivasyonunu sağlayarak bu üretime katkıda bulunur. MMP2nin plasmin tarafından

aktive edilebilmesi plasminojen/plasmin sisteminin MMP'lar ile ilişkiye girdiği basamaktır. İnflamatuar proses şiddetlendikçe MMP-3 ve MMP 9 genleri indüklenir ve MMP'ların latent formları oluşur. MMP-9 indüksiyonu sitokinler ve erken gen ekspresyonu tarafından yönetilir. Latent MMP-9'un aktif hale gelmesi diğer MMP'lar ve serbest radikaller ile olmaktadır. Hücre kültürlerinde, mikrogial hücreler tarafında üretilen MMP-3, serbest radikaller ve plasmin ile MMP-9 aktivasyonu sağlanmıştır (109).

2.4.Melatonin ve Genel Özellikleri

Pineal bezin majör hormonu olan melatonin, epifiz bezinde triptofan aminoasitinden sentezlenir ve plazmada proteinlere (albumin vb.) bağlıdır. Çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatonin sülfatdır (6-HMS). İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır (110). Melatoninin kimyasal yapısı Şekil 11' de gösterilmiştir (110).



Şekil 11: Melatoninin kimyasal yapısı

Melatonin en ilkelinden (tek hücreli algler örnek: *Gonyaulax polyedra*) en gelişmişine kadar bütün aeorbik organizmalarda bulunan, evrim boyunca korunmuş bir moleküldür. Buna karşın sanıldığı gibi hidrofobik değildir. Sudaki çözünürlüğü $5 \times 10^{-3} M$ olarak tespit edilmiştir. Melatonin bu özelliği sayesinde kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve tüm subseleler kompartmanlara hızla diffüze olur. Melatoninin serbest radikal tutucu özelliği nedeniyle yaşa bağımlı dejeneratif olayları engellemede yararlı olabileceği düşünülmektedir (111,112,113).

Melatoninin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör, çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır. Genel olarak, ışık melatonin hızını azaltır, karanlık ise artırır. Melatonin sentezinin pineal bezden başka retina, bağırsak gibi organlarda da gerçekleştiği gösterilmesine rağmen bunun kan melatonin düzeyine etkisi yok denecek kadar azdır. Melatonin üretildikten sonra lipofilik özelliğinin çok yüksek olmasından dolayı, hızlı bir biçimde önce kana, beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere tüm

biyolojik sıvılara ve tüm dokulara dağılır. Anneden fetüse ve süt yoluyla yeni doğana geçebilir (114).

Sağlam hücre tiplerinde fizyolojik şartlarda yaşlanma ile apoptozis artar ve pineal bezden melatonin salgılanması azalır. Dışarıdan verilen melatonin sayesinde apoptozisin inhibe edildiği ve yaşlanmayla artan hasarlanmış, disfonksiyonel hücrelere karşı koruyucu rol oynadığı gözlenmiştir (110).

Yapılan son çalışmalar endojen antioksidan maddelerden en güçlüsünün melatonin olduğunu göstermiştir (112). Melatonin molekülü kolaylıkla oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vitamin E, C vb.) daha güçlü serbest radikal süpürücü özelliği vardır (112). Melatoninin hidroksil radikali nötralize etme özelliğinden dolayı glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Özellikle yaşlanmaya bağlı immün yetersizliklerde immün yanıtı artırıcı etkisi bilinmektedir (114).

Pineal bezin, tümör büyümesini inhibe edici bir özelliğe nedeniyle sahip olmasında yaklaşık yirmi yıldan beri bilinmektedir. Melatonin, göğüs kanserinde rol alan hormonları etkileyerek bu hormonların azalmasını sağlamaktadır. Pineal bezin antikanser etkisi büyük oranda melatonine bağlanmıştır. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada artan oksidatif hasar, dolaşımdaki azalmış melatonine bağlanmıştır (110).

Pineal bezi çıkartılmış deneklerin ortalama yaşam sürelerinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca genç deneklerin (4 aylık) pineal bezinin yaşlı deneklere (18 aylık) transplantasyonu, yaşlı deneklerin yaşam süresini anlamlı ölçüde uzatmakta, buna karşılık yaşlı deneklerin pineal bezinin genç deneklere transplantasyonu yaşam süresini anlamlı olarak kısaltmaktadır (110).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, melatonin tedavisinin yaşam süresinde %25' lik artışa neden olduğu bu sıçanların daha genç, sağlıklı ve güçlü görüldüğü, seksüel aktivitelerinin de daha uzun süre devam ettiği bildirilmiştir (115).

Başka bir çalışmada dişi sıçanlara günlük 100 µg melatonin enjeksiyonu yapıldığında, bu sıçanların yaşam süresinin arttığı, özellikle de 08.00-10.00 saatleri arasında melatonin uygulanan grupta bu farkın daha belirgin olduğu görülmüştür (111).

Pineal bezden salınan bir hormon olan melatoninin (5- methoxy-N-acetyltryptamine) birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, hücre içi kalsiyum düzeyini düzenleyebilmesi, güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon

radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonu) ve antioksidan (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimulasyonu ve nitrik oksit sentez inhibisyonu) özelliğinin olması, iskemi reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (110).

Melatonin, hücrelerde mRNA miktarlarının artmasını sağlayarak hücrel antioksidan savunma sistemini uyarır ve prooksidatif enzim miktarlarının azalmasını sağlar (111).

Oksidatif stres ve DNA hasarı apoptozisi indükleyen en önemli iki faktördür. Oksidatif stres, sinir sistemi rahatsızlıklarında, nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson, epilepsi) önemli rol oynar. Melatoninin antioksidatif enzimleri aktive etmesi sonucu, oluşan hasarın önleniği gözlenmiştir. Melatonin, spinal kord yaralanmaları sonucu artan lipid peroksidasyonunu azaltarak nöronal hasarı önlediği bildirilmiştir (116).

İmmün sistemin düzenlenmesi, zararlı ajanlara karşı korunması apoptotik mekanizmayla sağlanmaktadır. Timusta meydana gelen herhangi bir hasarda melatonin miktarının arttığı belirlenmiştir (117).

Pek çok özelliği sayesinde melatoninin, beyin hücrelerinde ve diğerk dokularda apoptozisi inhibe ettiğii son çalışmalarla ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada melatoninin, overektomi yapılmış ratlarda travmatik beyin hasarının tahrip edici etkilerini engellediği görülmüştür (118). Son yıllarda melatoninin mitokondriyel homeostazisi sağladığı bulunmuştur (119). Melatoninin nöronal dokulardaki koruyucu etkisi hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir (120).

2.5. Kafa Travmasında Klinik Tedavi

Kafa travmalarında tedavinin amacı; artmış kafa içi basıncını düşürmek, beyin dokusunu ilave hasarlar ve komplikasyonlardan korumak, beyni ikincil nöronal hasardan koruyucu tedbirler almak, beyin dokusunda iyileşme potansiyeli olan hücreler için en iyi biyolojik koşulları sağlamaktır. Bu amaçla beyin ödemi tedavisi hidrostatik, ozmotik ve onkotik güçlerin biçimlendirilmesi ilkesine dayanır. Bu terapötik hedeflerde fizyolojik sınırlardan herhangi bir sapma dikkatle izlenmeli ve olabildiğince hızla düzeltilmelidir. (121).

Klinikte uygulanabilecek anti ödem tedavi yöntemleri şu şekildedir:

2.5.1. Pozisyonlama

KİB'ni azaltmanın en etkin yöntemlerinden biri hastanın yatak baş kısmının 30 derece yükseltilmesidir. Bu sayede kafa içi basıncının yanı sıra ortalama arter basıncı ve serebral perfüzyon basıncı düşer (121).

2.5.2. Solunum desteği

Solunum sıkıntısı içinde bulunan veya Glasgow Koma Skoru (GKS) 8'in altında olan hastalar entübe edilmelidirler (121).

2.5.3. Hiperventilasyon

pCO₂ düzeyi erişkinde 25-30 mm Hg, çocukta 15-25 mm Hg düzeyine gelene kadar hiperventile edilir. pCO₂ düzeyindeki bu düşüş kafa içi damarlarda daralma oluşturarak kafa içi volüm ve kafa içi basıncının azalmasına neden olur (122).

2.5.4. Sıvı tedavisi

Genel anlamda sıvı tedavisi; idame, kayıpların yerine konması ve defisitinin düzeltilmesi şeklinde olmalıdır. Beyin ödeminin tedavisindeki son gelişmeler tedavinin hipertonik-hiperonkotik çözeltilerle yapılması doğrultusundadır (121).

2.5.5. Metabolik fonksiyonların düzenlenmesi

Hipertansiyon kontrolünün sağlanması, arteriyel yol ve sık arteriyel kan gazları takibi önerilir. Kan şekeri düzenlenerek hiperglisemi ve hipoglisemiden korunmalıdır (123).

2.5.6. BOS salgılanmasını azaltıcı tedavi

Diüretik, steroid, karbonik asit inhibitörü gibi ajanlar kullanılarak BOS salgılanması azaltılabilir (124).

3.5.7. Ozmotik tedavi

Doku suyunu ve beyin ödeminin azaltmanın en hızlı ve etkili yöntemi ozmoterapidir. İstirahattaki bir hastada 10 dakika süreyle kafa içi basıncı 20 mm Hg üzerinde olursa ozmotik tedaviye başlanır. Oral veya intravenöz yolla verilen üre, albumin ve gliserin gibi ajanlar beyin ödeminin tedavisinde uzun süre kullanılmış ancak böbrek işlevleri ve hemodinami üzerindeki olumsuz sistemik etkileri nedeni ile tedavide etkinlikleri sınırlı kalmıştır (124).

2.5.7.1. Mannitol

Travmatik beyin ödeminin tedavisinde en fazla kullanılan ajandır (125). Kafa içi basıncı azaltmak için kullanılır. Plazma ve beyin arasında bir ozmotik basınç farkı oluşturarak ödem sıvısının beyinden plazmaya geçişini sağlar. Kafa içi basıncı düşürücü etkisinin başlaması 1-5 dakika arasındadır. Maksimum etkisi 20-60 dakikadır. 0,25

gr/kg mannitol dozunun bazı hastalarda KİB'ı azaltmada yeterli olduğu gösterilmiştir. Ancak doz 1 gr/kg'a kadar çıkılabilir. Önceki yüksek doz daha sonraki dozun etkinliğini azaltır. Bunun için en ufak etkin dozu kullanmak gerekir. Mannitolun etkinliği lup üzerinden etki eden diüretiklerin kullanımı ile birleştiği zaman sinerjik olarak artar. Serum ozmolaritesi 320 mOsm/L' nin altında olduğu sürece etkilidir. Bu düzeyin üzerinde böbrek yetmezliği ve sistemik asidoz meydana gelebilir (126).

2.5.7.2. Furosemid

Loop diüretik sınıfındandır. Etkisini böbrek glomerüllerinde henle kulpunun kortikal çıkan kalın bacağına Na-K-Cl taşıyıcıları üzerine etki yaparak NaCl'ün geri emilimini engellemek yoluyla gösterir. Loop diüretikler serum tonisitesini arttırarak ve ayrıca BOS yapımını yavaşlatarak kafa içi basıncını azaltırlar (125).

2.5.8. Sedatif ve analjezikler

Bu ilaçların akut durumlarda kafa içi basıncının dönemsel yükselmelerine karşı etkili olduğuna inanılmaktadır. Akut dönemde en sık kullanılan sedatif analjezik ise intravenöz morfindir. Sedatif dozlarda özellikle ventilasyon kontrol altında iken güvenle kullanılabilir (127).

2.5.9. Paralitik tedavi

Kürar, vekuronium, pankuronium, süksinilkolin, atrokurium gibi kas gevşeticiler güvenli bir aralık içinde kafa travması sonrası kafaiçi basınç artışı olan olguların resussitasyon, entübasyon ve cerrahi anestezi işlemlerinde kullanılmaktadır (128).

2.5.10. BOS tahliyesi

Kafaiçi basıncını düşürmede önemli bir yeri vardır. İntraventriküler kateter yardımıyla 3-5 ml BOS boşaltılması kafaiçi basıncını azaltacak ve ödem sıvısının ventriküller içine geçişine olanak sağlayacaktır. Ayrıca lökotrien C4 ve IL-6 gibi proinflamatuvar kemokinlerin ortamdan uzaklaştırılması olanaklıdır (121).

2.5.11. Barbitürat tedavisi

Kafa travmalı hastalarda kontrolsüz artan kafa içi basıncından nöral elemanları korumak için kullanılmaktadır. Kafa içi basıncı 25 mmHg üzerine çıkarsa başlanması önerilir. Etkisini beyin metabolizmasını yavaşlatarak enerjiye olan ihtiyacı azaltması yoluyla gösterir. Böylece iskemi durumunda ve serebral komplians azaldığında kalıcı hasar gelişmeden endojen tamir mekanizmaları görev yapabilir (129).

2.5.12. Dekompressif kraniyektomi

Dekompresyon cerrahisi, tüm medikal tedavilerin uygulanmasına rağmen tedaviden fayda sağlanamıyorsa özellikle gençlerde önerilmektedir. Literatürde, iskemik olaylarda dekompresyonun infarkt alanını azalttığı bildirilmektedir (129).

Sözü edilen tüm medikal ve cerrahi yöntemlere rağmen halen etkin ve sonuç alıcı bir anti ödem tedavi protokolü üzerinde fikir birliği yoktur. BOS, ödem sıvısının tahliyesi ve venöz sisteme boşaltımı açısından önemli bir ortam oluşturur. Kuramsal olarak, hasar bölgesinden BOS'a boşalan ödem sıvısının akış dinamiği ventriküle verilecek sıvı çekici birtakım ajanlarla hızlandırılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi ve Tıbbi Etik Kurulu tarafından onaylandıktan sonra Kasım 2010- Ocak 2011 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 80 adet dişi erişkin Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanı Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi ve takibi yapıldı. Çalışma İnönü Üniversitesi Deney Hayvanı Üretim ve Araştırma Merkezinde normal cerrahi aletler ve yüksekte ağırlık düşürme yöntemi için gerekli cihaz kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1. Anestezi

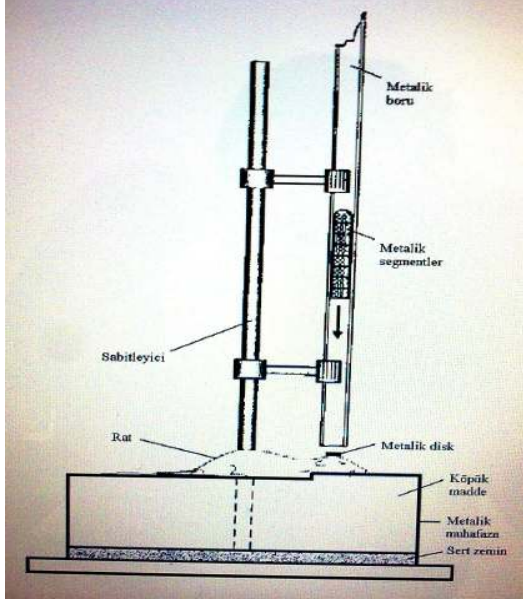
Deney hayvanlarına anestezi, cerrahi işlem öncesi 75 mg/kg ketamin hidroklorür (Parke Davis, İstanbul) ve 10 mg/ kg ksilazin hidroklorür (Rompun % 2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer-Türk İlaç Ltd. İstanbul) spontan solunumda intraperitoneal uygulanmak suretiyle gerçekleştirildi. Anesteziye, gerektiğinde tekrarlanan ksilazin enjeksiyonları ile devam edildi

3. 2. Travma modeli ve uygulanması:

Ratlarda travma modeli oluşturulurken Marmarou ve arkadaşlarının 1994 yılında geliştirdikleri model örnek olarak alındı (Şekil 12) (Resim 1) (130).

Travma mekanizmasının ana prensibi, metalden yapılmış 9 gr. ağırlığın yer çekiminin etkisi ile cam boru içerisinden ratların kafasındaki travma yapılacak beyin hemisferi üzerine konulan metal diske düşürülmesinden ibarettir. Travma aleti, 50 cm. boyunda, dış çapı 12 mm, iç çapı 10 mm. olan cam bir tüp, bu tüpü vertikal şekilde tutan bir sabitleyici, ratların yerleştirildiği 15x10 x25 cm. ebatlarında köpük madde, 2 mm yüksekliğinde ve 10 mm. çapında paslanmaz çelikten metal disk ve 9 gr. ağırlığında 9 mm. çapında 3 adet metalik segment içermektedir. Ayrıca kraniektomi için dental tur

aleti kullanıldı. Cam tüpün yüksekliği ve düşürülecek ağırlık hesaba katılarak uygulanacak ağırlık $E=mgh$ formülü ile 450 gr.olarak belirlendi. Bu şartlar sağlanarak travma modeli standartize edilmiş oldu.

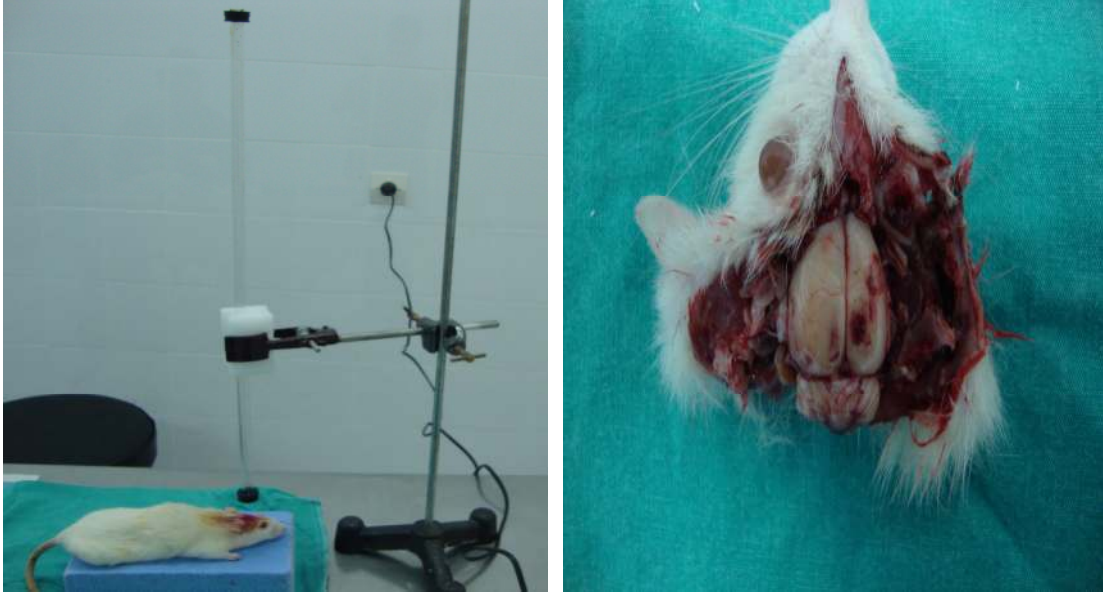


Şekil 12 : Travma aleti



Resim 1: Travma düzeneği

Travma aleti hazır olduğunda, düz zemin üzerinde yatan ratlara orta hatta dikey olacak şekilde bir cilt insizyonu yapıldı. İnsizyondan sonra orta hat ve sağ koronal sütür tanındı. Periost, sağ tarafta ortaya konan sahada kemikten sıyrıldı. Temporal adale yapışma yerinden kesilerek temporal kemik üzeri serbestleştirildi. Dental tur yardımıyla sağ paryetal kemiğin ortasında bir delik açıldı. Bu işlem sırasında beyin dokusunu ısı etkisinden korumak amacıyla uygulama bölgesi kısa aralıklarla serum fizyolojik ile yıkandı. Dura bütünlüğü bozulmadan açılan delik, kıvrık uçlu bir mini hemostat ile genişletildi. Temporal kemiğin paryetal komşuluğu da dahil olmak üzere orta hattın sağında, dura sağlam bırakılmak koşuluyla, 10x15 mm boyutlarında bir kraniyektomi sahası oluşturuldu. Gereğinde dura kanamaları için oksitlenmiş selüloz (Surgicel, Ethicon, İstanbul), kemik kanamaları için Bone-wax (Ethicon, İstanbul) kullanıldı. Kraniyektomiden sonra ratlar prone pozisyonunda köpük yatağın üzerine yerleştirildi. Daha sonra ratlara 450 gr/cm kuvvet uygulanarak kafa travması oluşturuldu (Resim 2,3). Kafa travmasından sonra cilt tek kat olarak kapatıldı. Bu işlemler yapılırken asepti kurallarına uyuldu.



Resim 2.3. Kafa travmasının oluşturulması

3.3. Deney Grupları

Bu çalışmada, kontrol grubu (travma yapılmayan) (n=5), travma (n=25) , travma + melatonin (20 mg/kg/gün dozunda 1ml. %2.5 alkol çözeltisiyle birlikte verildi) (n=25) ve travma + plasebo (%2.5 alkol) (n=25) olmak üzere 4 ana grupta toplam 80 adet Wistar albino rat kullanıldı. Kontrol grubu, Travma , Travma + melatonin ve travma + plasebo grupları her biri 12, 24, 72, 120 ve 168.saatler olmak üzere 5 alt gruba ayrıldı. Her alt grupta 5 adet rat kullanıldı.

1.Grup (Kontrol Grubu):

5 adet rat travma uygulanmadan anestezi sonrası dekapite edilerek hemisferleri alındı.

2.Grup (Travma uygulanan grup):

25 adet rat, 5 alt gruba ve her bir alt grupta 5 rat olacak şekilde travma uygulanmasını takiben 12.saat, 24.saat, 72.saat, 120.saat ve 168.saatlerde dekapite edilerek sağlam ve travmatize beyin hemisferleri ayrı ayrı alındı.

3.Grup (Travma öncesi melatonin verilen grup):

25 adet rat aynı şekilde 5 alt gruba ve her bir alt grupta 5.rat olacak şekilde travmadan 6.saat önce melatoninin, % 2.5 alkol çözeltisiyle birlikte verilmesini takiben 12.saat, 24.saat, 72.saat, 120.saat ve 168.saatlerde dekapite edilerek sağlam ve travmatize beyin hemisferleri ayrı ayrı alındı.

4.Grup (Travma öncesi plasebo olarak %2.5 alkol verilen melatonin kontrol grubu):

25 adet rat melatonin kontrol grubu olarak gene 5 alt gruba ve her bir alt grupta 5.rat olacak şekilde travmadan 6.saat önce sadece %2.5 alkol verilmesini takiben 12.saat, 24.saat, 72.saat, 120.saat ve 168.saatlerde dekapite edilerek sağlam ve travmatize beyin hemisferleri ayrı ayrı alındı.

3.4. Sakrifikasyon ve doku örneklerinin alınması

Kontrol grubundaki hayvanların beyinleri anestezi sonrası herhangi bir işlem yapılmadan dekapite edilerek alındı.

Diğer gruplar ise 5 alt gruba ayrıldı ve travma uygulanmasını takiben 1.alt grup 12. saatte, 2. alt grup 24. saatte, 3. alt grup 3.günde (72. saat), 4. alt grup 5. Günde (120. saat) ve 5. alt grup 7. günde (168. saat) dekapite edilerek sağlam ve travmatize beyin hemisferleri ayrı ayrı alındı.

3.4.1. Sakrifikasyon işlemi

Tüm gruplarda yer alan ratlara, önceden belirlenen süreç sonrasında derin anestezi oluşturularak torakotomi yapıldı. Torakotomiye takiben 5 dakika süreyle intrakardiyak serum fizyolojik verilerek doku perfüzyonu yapıldı. Böylece beyin dokusu kan elemanlarından arındırılmış oldu. Daha sonra ratlar dekapite edilerek beyin dokuları sağlam ve travmatize hemisferler şeklinde iki parça halinde ayrı ayrı alındı.

3.4.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Histopatolojik inceleme için alınan örnekler % 10 formaldehid içeren tüplere konuldu. Dokular 24 saat oda ısısında bekletilip tespit edildikten sonra +4 derecede buzdolabına alındı.

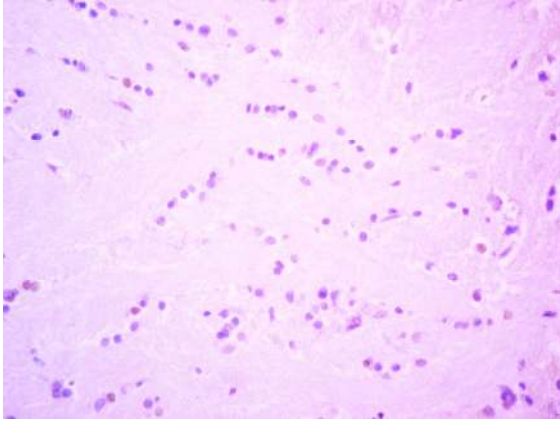
3.4.2.1 Histopatolojik incelemeler

Tüm gruplardan elde edilen beyinlerin yarıları rutin olarak formalin tespitine alınarak parafin bloklar hazırlandı. Sonrasında, 6 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin ve eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

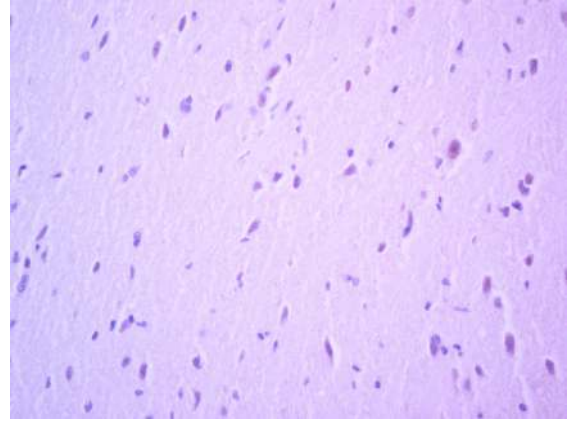
3.4.2.2. İmmunohistokimyasal incelemeler

Formalin tespit edilerek parafine gömülen doku örneklerinden alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler immunohistokimyasal olarak aktif K3, K8 ve MMP-9 antikorları ile boyandı. Boyamada; doku kesitleri ksilen ve alkol serisinde dehidre edildikten sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH 7.4) ile yıkandı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi doku kesitlerinin % 0.3' lük H₂O₂ ile 15 dakika muamele edilmesiyle engellendi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla kesitler 1 M'luk sodyum

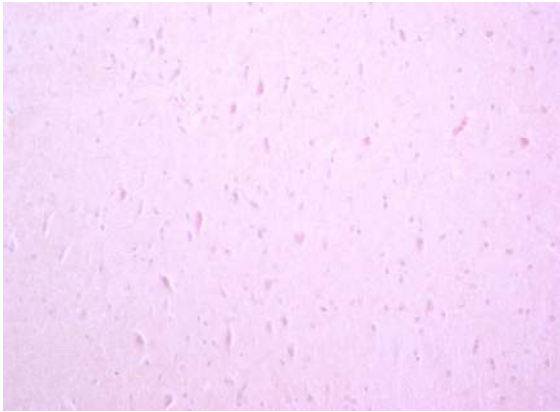
sitrat solüsyonu (pH 6.0) içerisinde 12 dakika mikrodalga fırında muamele edildi. Birkaç defa PBS ile yıkanan doku kesitleri, spesifik olmayan antikor bağlanmasını engellemek amacıyla, %10'luk keçi non-immun serumu damlatılarak 30 dakika bekletildi. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içerisinde 1 saat oda sıcaklığında primer antikorlar ile inkube edildiler. Kullanılan antikorlar ve dilusyonları şöyleydi: Aktif K3'e karşı tavşan poliklonal antikor (1:300 oranında sulandırılmış; Abcam, Katalog No: ab13847), caspase 8'e karşı tavşan poliklonal antikor (1:100 oranında sulandırılmış; Abcam, Katalog No: ab4052) ve MMP-9'a karşı fare monoklonal antikor (1:100 oranında sulandırılmış; Abcam, Katalog No: ab58803). Primer antikorlar ile inkubasyonu takiben boyama Zymed'in Histostain_+Plus Bulk Kiti (Katalog No: 85-9043) ve 3,30-diaminobenzidine ile üretici firmanın tarifine uygun olarak gerçekleştirildi. Son olarak doku kesitleri Mayer'in hematoksileni ile boyanarak, musluk suyunda durulandı ve alkol-ksilen serisinden geçirilerek lamel kaplandı ve bir ışık mikroskobunda değerlendirildi (Resimler 4, 5, 6).



4



5



6

Resim 4. Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki K 3 immunoreaktivitesi. (IH, x 360)

Resim 5. Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki K 8 immunoreaktivitesi. (IH, x 360)

Resim 6. Travma uygulanan hemisferde 3.gündeki MMP-9 immunoreaktivitesi; (IH, x 185)

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 15.0 programında tanımlayıcı veriler ortanca (Min-max) olarak verildi. Normal dağılım varsayımı sağlanmadığı için, grupların ortancaların karşılaştırılmasında Kruskal wallis H testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar Conover testi ile yapıldı. $P<0.005$ değeri önemli kabul edildi. $P< 0.05$ anlamlı olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1.İmmunohistokimyasal Bulgular

Travmatize hemisferdeki immünohistokimyasal verilerin dağılım değerleri Tablo 6.ve 7’de gösterilmiştir.

Grup	Saat	K3 Median (minimum- maksimum)*	K 8 Median (minimum- maksimum)*	MMP-9 Median (minimum- maksimum)*
Kontrol		0,0 (0-1)	1,0 (0-1)	0,0 (0-1)
Travma				
Travma1	12.S	9,0 (9-10)	10,0 (9-11)	10,0 (8-11)
Travma2	24.S	14,0 (14-15)	15,0 (14-16)	15,0 (13-16)
Travma3	72.S	15,0 (13-16)	10,0 (9-11)	15,0 (13-16)
Travma4	120.S	10,0 (10-11)	10,0 (9-11)	9,0 (9-11)
Travma5	168.S	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)
Travma+Melatonin				
Travma+Melatonin1	12.S	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)
Travma+Melatonin2	24.S	10,0 (9-11)	10,0 (9-11)	10,0 (9-11)
Travma+Melatonin3	72.S	10,0 (9-11)	10,0 (9-11)	9,0 (9-11)
Travma+Melatonin4	120.S	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)
Travma+Melatonin5	168.S	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)
Travma+Plasebo				
Travma+Plasebo1	12.S	9,0 (8-12)	9,0 (8-11)	10,0 (9-11)
Travma+Plasebo2	24.S	14,0 (13-16)	13,0 (13-16)	15,0 (14-16)
Travma+Plasebo3	72.S	14,0 (14-15)	10,0 (9-11)	14,0 (14-15)
Travma+Plasebo4	120.S	10,0 (9-11)	10,0 (9-11)	10,0 (9-11)
Travma+Plasebo5	168.S	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)	5,0 (4-6)

Tablo 6. Verilerin dağılımı. (*40’lık objektifte mikroskopik sahada immün boyanma gösteren hücrelerin sayısı)

	İmmünoreaktivite seviyesinde düşüş %		
Saat	K3	K8	MMP-9
12	45	50	50
24	29	44	44
72	44	0	40
120	50	50	45
168	0	0	0

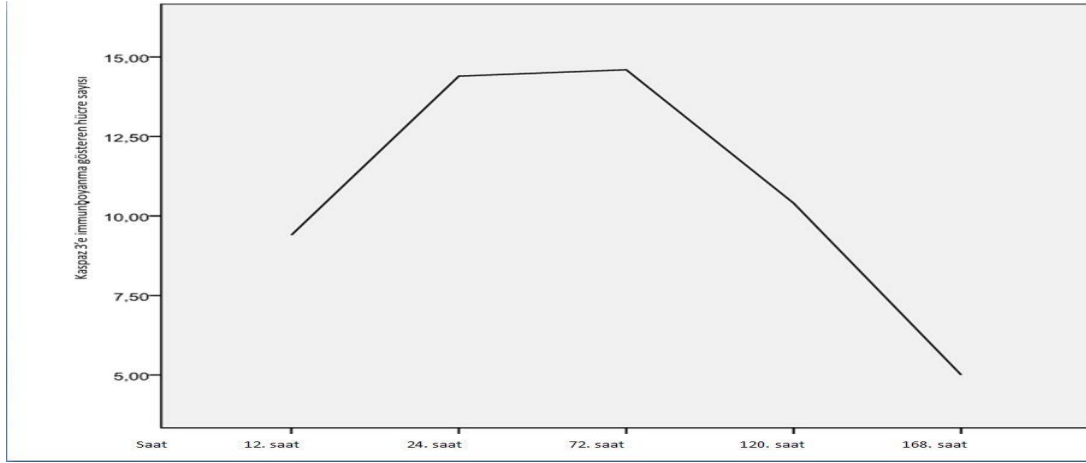
Tablo 7: İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.

Kontrol grubunda K3 ve MMP-9’da mikroskopik sahada immunboyanma gösteren hücre sayısı 0,0 (0-1) iken, K8’de 1,0 (0-1) ’di .

Yapılan immünohistokimyasal boyamalarda travmatize olmayan hemisferde K3, K8 ve MMP-9’a karşı kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir immünoreaktivite tespit edilmezken travmatize hemisferde bu göstergelere karşı oluşan immünoreaktivite anlamlı derecede belirgindi ($P < 0.05$).

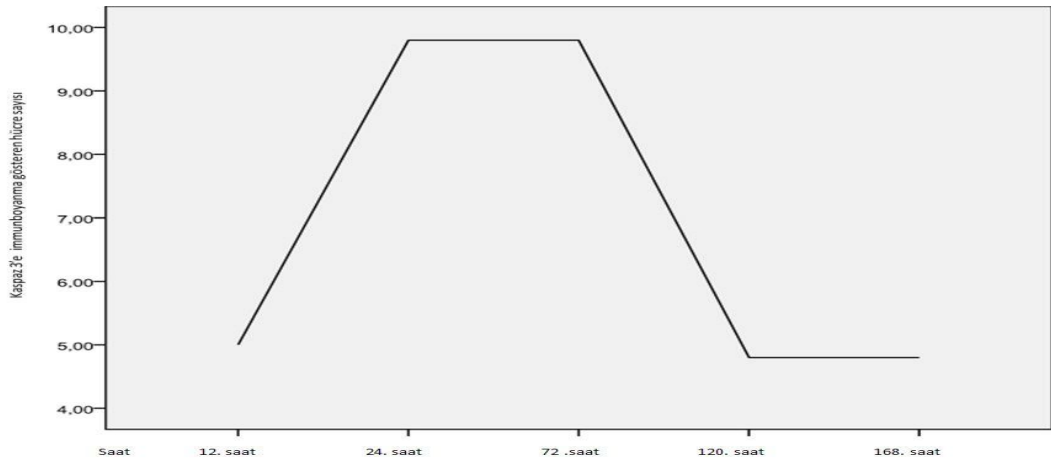
4.1.1.Kaspaz 3

Travma grubunda travmanın 12.saatinde mikroskopik sahada K3’e karşı immün boyanma gösteren hücre sayısı 9,0 (9-10) ulaştı. Bu değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$). Travmanın 24. saatindeki K3 immünoreaktivitesi her mikroskopik sahada 14,0 (14-15) hücreye, 72. Saatinde ise 15,0 (13-16) hücreye ulaştı. Boyanan hücre sayısı bu saatten sonra düzenli bir şekilde düşmeye devam ederek 120. saatte 12. saattekiyle aynı düzeye geldi, 168. saatte ise 12. saatteki seviyenin altına düştü (Şekil 13). 168. saatte değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken, 12. saattekine göre anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.05$). Bu grupta, 24. ve 72. saatler arasında K3 immunoreaktif hücrelerin sayısında anlamlı bir fark yokken, bu iki alt gruptaki hücre sayıları travmanın 12.saatine ile 120 ve 168. saatlerindeki alt gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. 168. Saatteki immünoreaktif hücre sayısı da ayrıca 120. saate göre anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Travma grubunda K 3 immünoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen travma grubunda K3 immünoreaktivitesindeki artış, travmanın 12.saatinde 5,0 (4-6), 24. ve 72. saatlerinin 10,0 (9-11) ve 120. ve 168. saatlerinde 5,0 (4-6) idi ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. ($P < 0.05$) Bu değerler, travma grubuna göre ise anlamlı derecede düşüktüler ($P < 0.05$). Travma+melatonin grubunun 168. saatteki K3 seviyesi travma grubuyla aynıydı. Melatonin verilen travma grubundaki zamanlar arası farkların dağılımı travma grubundaki dağılıma benziyordu (Şekil 14).



Şekil 14. Travma+ melatonin grubunda K 3 immünoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen ratlarda travmatize hemisferdeki K3'e bağlı immünoreaktivite seviyesinde travma grubuna göre düşme oranı 12.saatte % 45, 24.saatte % 29, 72. saatte % 44, 120. saatte % 50 ve 168. saatte % 0'dı (Tablo 8).

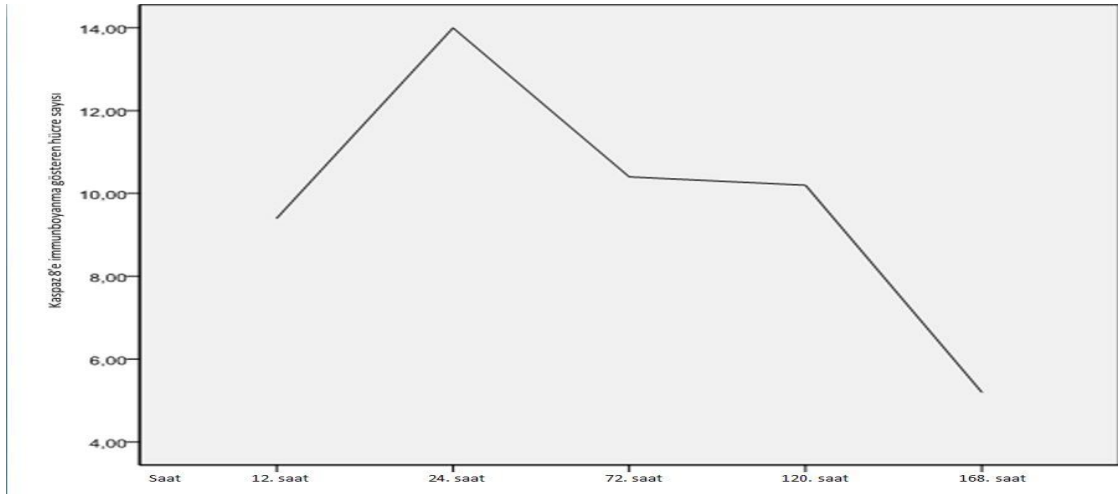
	İmmünoreaktivite seviyesinde düşüş %
Saat	K3
12	45
24	29
72	44
120	50
168	0

Tablo 8. K3 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.

Travma + plasebo grubunda ise K3 immunoreaktivitesi 12.saatte 9,0 (8-12) 24.saatte 14,0 (13-16) 72.saatte 9,0 (9-11), 120. saatte 10,0 (9-11) ve 168. saatte 5,0 (4-6) hücreydi. Travma grubuna göre anlamlı derecede düşük olan 72. saattekilerin dışında bu grubun immünoreaktivesi ile travma grubundakilerin arasında anlamlı bir fark yoktu.

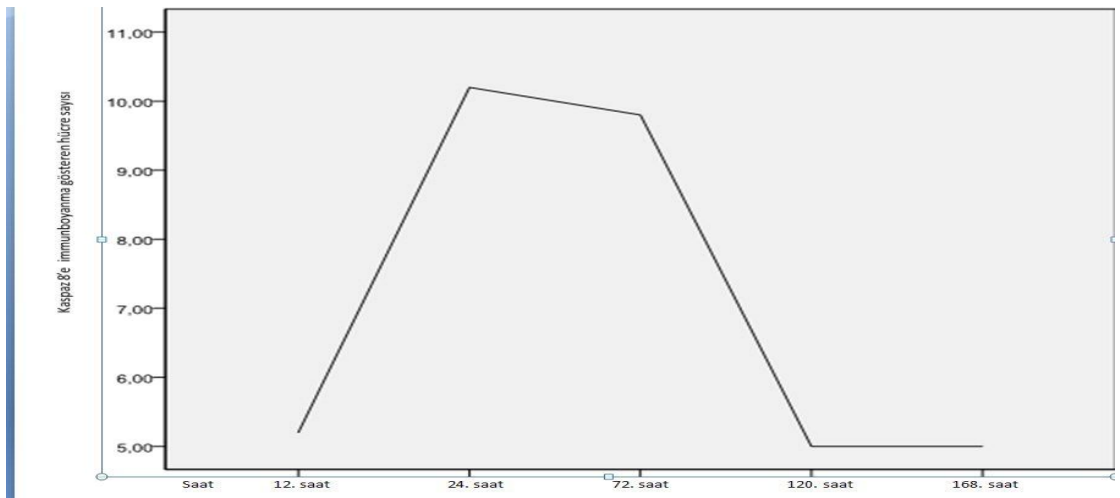
4.1.2.Kaspaz 8

K8 immunoreaktivitesi gösteren hücre sayısı artış 12. saatte, K3' deki benzer şekilde 10,0 (9-11)' du. Travmanın 24. saatindeki K8 immunoreaktivitesi her mikroskopik sahada 15,0 (14-16) hücreye ulaştı, 72. saatinde hücre sayısı K3' dekinden farklı olarak 10,0 (9-11) hücreye düştü. 120. saatte de 10,0 (9-11) olan boyanan hücre sayısı 168. saatte 12. saatteki seviyenin altına, mikroskobik alanda 5,0 (4-6) hücreye düştü (Şekil. 14a). K3' dekinden farklı olarak, K8 bakımından 24. ve 72. saatler arasında immunoreaktif hücrelerin sayısında anlamlı bir fark vardı ve K8 seviyesinin pik yaptığı 24. saatteki hücre seviyesi diğer alt gruplara göre de anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$). 72. ile 120 saatler arasında K8 immunoreaktif hücrelerin sayısında anlamlı bir fark yokken, 168. saatteki immünoreaktif hücre sayısı tüm grupların altındaydı ($P < 0.05$) (Şekil 15). Bu dağılımın K3' ünkinden farklı, düşüşün daha erken başlaması ama 72. İle 120. saatler arasında duraklayarak bir plato oluşturmasıydı.



Şekil 15. Travma grubunda K 8 immünoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen travma grubunda K8 immünoreaktivitesindeki artış, travmanın 12.saatinde 5,0 (4-6), 24. ve 72. saatlerinde 10,0 (9-11) ve 120. ile 168. saatlerinde 5,0 (4-6) idiler. Bu değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($P < 0.05$) iken, travma grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.05$). Travma+melatonin grubunun 168. saattindeki K8 seviyesi travma grubuyla aynıydı. Aynı zamanda travma+melatonin grubundaki K8 immünoreaktivitesinin zamanlar arasındaki farkların dağılımı, travma grubundaki zamanlar arası farkların dağılımına benziyordu. Melatonin verilen travma grubunda K8 immünoreaktivitesindeki artış, K3' deki benzer şekilde seyrederek travma grubuna göre daha geç (24.saat) belirginleşmekte ve daha kısıtlı kalmaktaydı. Bu dağılımın travma grubundan farkı ise 72. ile 120. saatler arasındaki platonun kaybolması ve düşüşün daha hızlı olmasıydı (Şekil 16).



Şekil 16. Travma+ melatonin grubunda K 8 immünoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen ratlarda travmatize hemisferdeki K8'e bağı immunoreaktivite seviyesinde travma grubuna göre düşme oranı 12.saatte % 50, 24.saatte % 44, 72. saatte % 0, 120. saatte % 50 ve 168. saatte % 0'dı (Tablo 9).

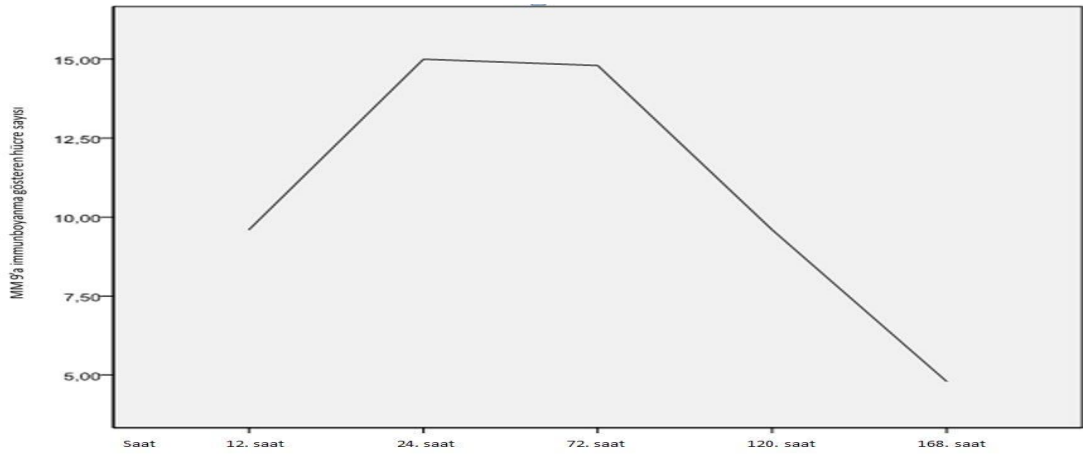
	İmmünoreaktivite seviyesinde düşüş %
Saat	K8
12	50
24	44
72	0
120	50
168	0

Tablo 9: K8 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağı düşme oranlarının dağılımı

Travma + plasebo grubunda ise K8 immunoreaktivitesi 12.saatte 9,0 (8-11) 24.saatte 13,0 (13-16), 72. ve 120 saatlerde 10,0 (9-11), 168. saatte ise 5,0 (4-6) hücreydi. Bu grubun immünoreaktivesi ile travma grubundakilerin arasında anlamlı bir fark yoktu.

4.1.3.MMP -9

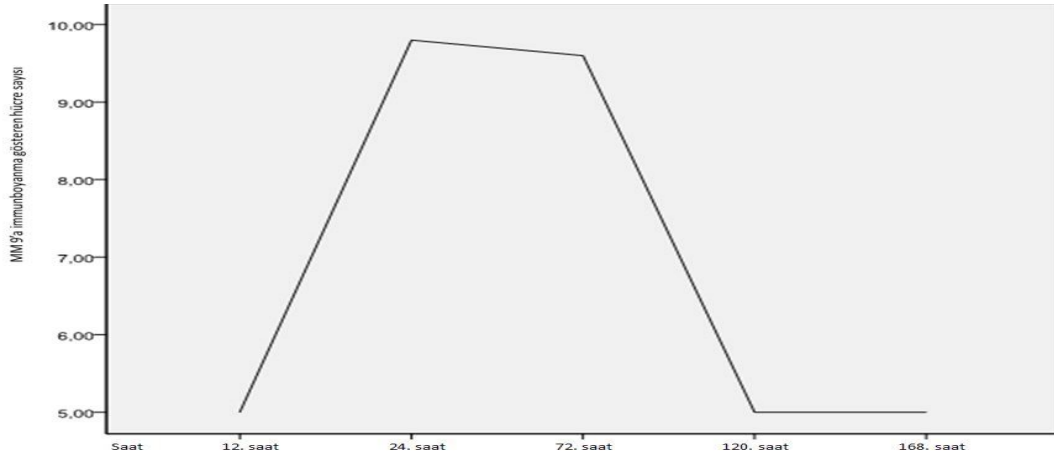
Travma grubunda travmanın 12.saatinde mikroskopik sahada MMP-9'a karşı immün boyanma gösteren hücre sayısı 10,0 (8-11) idi. Bu değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.05$). Travmanın 24. ve 72.saatindeki MMP-9 immunoreaktiviteleri her mikroskopik sahada 15,0 (13-16) hücreydi. Boyanan hücre sayısı bu saatten sonra düzenli bir şekilde düşmeye devam ederek 120. saatte 9,0 (9-11), 168. saatte ise 12. saatteki ile aynı seviye olan 5,0 (4-6) hücreye düştü. Bu grupta, 24. ve 72. saatler arasında MMP-9 immunoreaktif hücrelerin sayısında anlamlı bir fark yokken, bu iki alt gruptaki hücre sayıları travmanın 12.saatine ile 120 ve 168. saatlerindeki alt gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. 168. Saatteki immünoreaktif hücre sayısı da ayrıca 120. saate göre anlamlı derecede düşüktü ($P < 0.05$). MMP-9 immunoreaktivitesindeki artış travma grubunda, K3 ve K8 deki gibi 12.saatte belirginleşmeye başlamakta, K3'e benzer şekilde 24 ve 72.saatlerde en yüksek değerlerde seyretmekte, daha sonra düşmekteydi (Şekil 17).



Şekil 17. Travma grubunda MMP-9 immünoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen travma grubunda MMP-9 immünoreaktivitesi travmanın 12.saatinde 5,0 (4-6), 24. saatinde 10,0 (9-11) ve 72. saatlerinde 9,0 (9-11) ve 120. ile 168. saatlerinde 5,0 (4-6) idi. Bu değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($P < 0.05$) iken, travma grubuna göre anlamlı derecede düşüktüler ($P < 0.05$).

Travma+melatonin grubunun 168. saatteki MMP-9 seviyesi travma grubuyla aynıydı. Melatonin verilen travma grubundaki MMP-9 immünoreaktivitesinin zamansal dağılım eğrisinin travma grubundakinden farkı seviyesinin travma grubununkine göre anlamlı derecede düşük olması ve daha hızlı bir düşüş göstererek 120 saatte en düşük seviyeye ulaşmasıydı (Şekil 18).



Şekil 18. Travma+ melatonin grubunda MMP-9 immunoreaktivitesinin zamansal dağılımı

Melatonin verilen ratlarda travmatize hemisferdeki MMP-9'a bağlı immünoreaktivite seviyesinde travma grubuna göre düşme oranı 12.saatte % 50, 24.saatte % 44, 72. saatte % 40, 120. saatte % 45 ve 168. saatte % 0'dı (Tablo 10).

	İmmünoreaktivite seviyesinde düşüş %
Saat	MMP-9
12	50
24	44
72	40
120	45
168	0

Tablo 10: MMP-9 İmmünoreaktivite seviyesinde melatonine bağlı düşme oranlarının dağılımı.

Travma + plasebo grubunda ise travmanın 12.saatinde mikroskopik sahada MMP 9’a karşı immün boyanma gösteren hücre sayısı 10,0 (9-11) 24. saatinde 15,0 (14-16), 72. ve 120. saatlerinde 10,0 (9-11), 168. saatte ise 5,0 (4-6) hücreydi ve bu grubun immünoreaktivesi ile travma grubundakilerin arasında anlamlı bir fark yoktu.

5. TARTIŞMA

Posttravmatik sekonder beyin hasarı primer doku hasarının oluşturduğu sinyallerle başlar. Karmaşık sinyalleşme olaylarının tetiklediği bu mekanizmalar henüz tam anlaşılamamıştır. Özellikle potansiyel reversibilitesinden dolayı sekonder hasarı oluşturduğu düşünülen mekanizmalar arasında en yoğun araştırmaların yapıldığı alan apoptozdur. Ancak bu çalışmalar ya apoptozisin varlığını ya da apoptozisi oluşturan kaspaz yolağının varlığını göstermeye yönelik çalışmalar olup. kaspaz dışı apoptozis yolaklarını gösterecek çalışmalar yok gibidir. Ayrıca bu yolakları tetikleyen mekanizmalara yönelik çalışmalar da pek yoktur (5,6). Biz bu çalışmamızda bir hemisferinde fokal kontüzyon oluşturduğumuz ratlarda kaspaza bağlı olan ve olmayan apoptoz yolaklarının zamansal ve mekansal dağılımlarını izledik. Ayrıca bu ratların bir grubuna güçlü bir anti oksidan olan melatonin vererek oksidatif stresin bu yolakların tetiklenmesi üzerindeki etkisini araştırdık.

Fokal kafa yaralanmasının, yaralanma merkezinden uzak bölgelerdeki etkisi konusunda bir çok araştırma yapılmıştır. Beer ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada travmaya ipsilateral hippocampus, kontralateral korteks ve hippocampusta apoptozisi gösteren herhangi bir K8 ve K3 aktivasyonuna rastlamadılar (131). Casey ve arkadaşları immatür ratlarda yaptıkları proton nükleer magnetik rezonans (NMR) çalışmasında N-asetil-aspartat (NAA)/ laktat (Lak) oranındaki düşüşe bakarak nöronal bütünlüğün bozulma derecesini araştırdılar ve sadece travmatize hemisferde değişiklikler tespit ettiler (132). Benzer şekilde immatür ratlarda çalışan ve travmaya bağlı sinaptik değişiklikleri araştıran Gobbel ve arkadaşları ise sinaptik proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikleri uzak sahalarda da gözlemlediklerini bildirdiler (133). Von Baumgarten ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada ise fokal beyin yaralanmasında bölgesel kan akımındaki değişikliklerin sadece ipsilateral hemisferde olduğu gösterildi (134). Çalışmaların sonuçlarındaki bu farklılıklar kullanılan hayvanların yaşlarındaki, cinslerindeki veya bakılan göstergelerdeki farklılıklardan

kaynaklanıyor olabilir. Bizde çalışmamızda Beer ve arkadaşlarının yaptığı gibi apoptozisi araştırdık ve onlardan farklı olarak K8 ve 3'e ek olarak MM-9'da baktık ve onların sonuçlarına benzer şekilde karşı hemisferde apoptozisi gösterecek derecede bir immünoreaktivite bulamadık.

Bu çalışmamızda 12. 24. 48. 72. 120. ve 168. saatlerde K3 ve K8 immünoreaktivitesini inceledik. 12. saatte anlamlı derecede yükselen K3 seviyesi 24. saatte zirveye ulaştı ve bir plato oluşturacak şekilde 72. saate kadar bu seviyede kaldı. 72. saatten sonra yükseldiğine yakın bir hızda düşüşe geçerek 168. saatte 12.saatteki seviyenin yaklaşık yarısı miktarına kadar azaldı (Şekil 13). Aynı şekilde 12. saatte anlamlı derecede yükselen K8 immünoreaktivitesi de K3'e benzer şekilde 24. saatte zirveye ulaştı ama K3'den farklı olarak bu noktadan itibaren aynı hızda inişe geçerek 72. saate yaklaşık 12. saatteki seviyelerine indi ve bir plato oluşturacak şekilde 120. saate kadar bu seviyede kaldı. Bu dönemden sonra da yükseldiğine yakın bir hızda düşüşe geçerek 168. saatte 12.saatteki seviyenin yaklaşık yarısı miktarına kadar azaldı (Şekil 15).

Bulgularımız, künt kafa yaralanması olan 103 kişide in situ nick translation (ISNT) tekniğiyle elde edilen beyin dokusunda nöronal apoptozisin 24 saatte pik yaptığını ve yaklaşık 22 hafta sürdüğünü gözlemleyen Housman ve arkadaşlarının bulgularını desteklemekteydi (10). Ratlarda kortikal darbe ile oluşturulan fokal beyin yaralanma sonrasında K8'in zamansal dağılımını, prokaspaz 8 ve bölünmüş K8 p20 hücre alt tiplerinin dağılımını inceleyen Beer ve arkadaşları K8 messenger RNA seviyelerinin 1 ila 72. saatler arasında yüksek olduğunu ve 24.saatte pik yaptığını buldular. Ayrıca K3'e pozitif olan hücre sayısının 24. saate kadar K8 'e pozitif olan hücre sayısı seviyesine ulaştığını ve bu seviyede pik yaptığını da tespit ettiler (131). Shoji ve arkadaşları travmatik beyin yaralanmasında inflamasyonla apoptozis arasındaki nedensel ilişkiyi araştırdıkları ve 3,12 ve 48. saatlerde K3 seviyesine baktıkları çalışmalarında da benzer şekilde K3 aktivitesinin 48. saatte zirveye ulaştığı tespit ettiler (7). Bizim çalışmamızdaki K3 ve K8'in zamansal dağılımı bu çalışmalardakine benzer bir dağılım göstermekteydi.

K8'le K3'ün eğrileri 12 ve 24. saatlerde birbirine paralel seyrederken K8'in düşüşe geçtiği 72.saatte K3.yüksek olarak kalması muhtemelen bu dönemde K3'ü aktive eden K8'in dışındaki başka faktörlerin de devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir

Hücrel strese yanıt olarak beyin hücreleri tarafından hem bünyesel hem de indüksiyonla ekspresse edilen MMP'lerin birçok patolojik durumla ilişkileri konusunda araştırmalar yapılmış olmasına rağmen kafa travmalarındaki sekonder beyin hasarı konusunda herhangi bir çalışma bulamadık. Bu çalışmamızda indüklenebilir bir MMP olan ve apoptotik hasarda rol aldığı düşünülen MMP-9 immünoreaktivitesinin travmalı beyinde artış derecesini ve bu artışın zamansal ve mekansal dağılımını araştırdık. MMP-9 immünoreaktivitesinin şiddetinin zamansal dağılımı K3'üne benziyordu ve 12. saatte anlamlı derecede yükselerek 24. saatte zirveye ulaşıyor ve bir plato oluşturacak şekilde 72. saate kadar bu seviyede kalıyordu. 72. saatten sonra yükselme hızına yakın bir hızda düşüşe geçerek 168. saatte 12.saatteki seviyenin yaklaşık yarısı miktarına kadar azalıyordu (Şekil 17).

Ekspresyon seviyeleri, yetişkin bir beyinde oldukça düşük olarak ekspresse edilen matriks metalloproteinazlar iskelet oluşumu, anjiyogenez, hücrel göç, inflamasyon, yara iyileşmesi, koagülasyon, akciğer ve kalp-damar hastalıkları, artrit ve kanser gibi çok sayıda biyolojik veya patofizyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir (102,103,105). MMP'ların akut beyin yaralanmalarındaki rolü konusunda herhangi bir çalışma yoktur. Ancak yapılan çalışmalarda enfeksiyon, otoimmün reaksiyonlar ve hipoksi/iskemi gibi indüklenen inflamatuvar yanıt sırasında, bu proteazların anormal ekspresyonu ve aktivasyonunun kan-beyin bariyerinin açılması, normal hücre sinyal iletimi engellenmesiyle sonuçlanacak şekilde ekstraselüler matriksin parçalanmasına ve sonunda hücre ölümüne yol açabildiği gösterilmiştir (11). Bizim çalışmamızda MMP-9'un zamansal dağılımının K3'üne benzemesi ve immünoreaksiyon seviyelerinin melatoninle düşürülmesi indüksiyonlarının benzer mekanizmalarla oluştuğunu düşündürmekte ve MMP-9 indüksiyonun da apoptozis sürecine katkısı olduğuna işaret etmektedir.

Endojen antioksidan savunma mekanizmalarının yetmezliği sonucu reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi nedeniyle oluşan oksidatif stres, diğer patolojik süreçlerde olduğu gibi travmada da apoptozis gibi nöron ölümüne yol açan ikincil olaylardaki nörotoksisitenin son ortak yolunu oluşturur (13). Biz bu nedenle travma oluşturulan ratlarda güçlü bir anti-oksidan ve serbest radikal süpürücü etkilerinin yanısıra anti-enflamatuvar ve immüno-modülatör etkileri de bulunan melatonin vererek apoptozisi engellemeye çalıştık.

Melatonin uygulanmasında 12, 24 ve 120. saatlerde K3, K8 ve MMP-9 immünoreaktivite seviyelerini benzer oranlarda anlamlı bir şekilde düşürürken ($P <$

0.05), 72.saatte K8'de herhangi bir düşüş görülmemesinin sebebini bulamadık. Bir diğer dikkati çeken bulguda travmatize grupta her üç göstergenin immünoreaktivite seviyelerinin 168. saatte aynı seviyeye (5,0 hücre/alan) düşmesiydi. Melatonin verilen grupta immüno reaktivite seviyeleri daha erken, 120 saatte bu seviyeye iniyordu ve 168. saate kadar aynı derecede kalıyordu. Bu bulgu bize travma sonrası apoptozisin akut dönemde yükselerek zirveye ulaştığını, subakut dönemde düşüşe geçtiğini ama durmadığını ve stabil bir seviyede devam ettiğini düşündürmektedir.(Şekil 14,16,18)

Bazı çalışmalarda melatoninin postravmatik ödemi ve postravmatik nöronal kaybı azaltarak nöronları koruduğu gösterilmiştir (120,135). Bizim bulgularımız bu nöronal kaybın azaltılmasının kısmen apoptozisin engellenmesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Melatoninin yüksek miktarlarda bile toksik olmadığı ve kan beyin bariyeri dahil tüm morfofizyolojik bariyerleri rahatlıkla geçtiği (113,136,137) düşünüldüğünde travma sonrası oksidatif strese bağlı olarak gelişen sekonder hasarı azaltabilmek için rahatlıkla kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

6. SONUÇ

Sonuçta oksidatif stres ve apoptozis ikilisinin birçok fizyopatolojik süreçte olduğu gibi postravmatik sekonder beyin hasarında da önemli bir katkısının olduğunu ve antioksidan tedavinin sekonder hasarı azaltabileceğini söyleyebiliriz. Yüksek miktarlarda bile toksik olmayan ve kan beyin bariyeri dahil tüm morfofizyolojik bariyerleri rahatlıkla geçebilen melatonin, travma sonrası oksidatif stresin tetiklediği apoptozis sonucu gelişen sekonder hasarı önleyici bir tedavide en uygun adaylardan biri olabilir. Ancak bunun için melatoninin, tek başına veya diğer anti-apoptotik ajanlarla birlikte kombine edilerek kullanıldığı daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

7.ÖZET

MELATONİNİN RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN TRAVMATİK SEKONDER BEYİN HASARINDAKİ APOPTOZİS SÜRECİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Çalışmamızda deneysel olarak fokal kafa travması oluşturulan ratlarda apoptoz göstergeçlerinin zamansal ve mekansal dağılımlarını inceledik. Ayrıca ratlara bir antioksidan olan melatonin vererek apoptozis göstergeçlerindeki düşüşü ve dolaylı olarak oksidatif stressin postravmatik apoptozise yani sekonder hasara katkısını araştırdık.

Materyal ve Metod: Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen 80 adet wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratları kontrol, travma, travma+melatonin ve travma+plasebo olmak üzere dört ana gruba ayırdık. Sonra bu ratları 12, 24, 72, 120 ve 168. saatlerde dekapite etmek üzere beşer alt gruba dağıttık. Deneysel olarak fokal kafa travması oluşturulan ratlarda apoptoz göstergeçleri olarak kabul edilen K3, K8 ve MMP-9'un zamansal ve mekansal dağılımlarını inceledik.

Bulgular: Çalışmamızda birçok fizyopatolojik süreçte olduğu gibi posttravmatik sekonder beyin hasarında da oksidatif stres ve apoptozis birlikteliğini gördük. Oksidatif stressin kaspaza bağlı yolakların dışında MMP-9 yolağını da indükleyerek apoptozise katkıda bulunduğunu, ancak bu göstergeçlere karşı immünoreaktivitelerin sadece travma oluşturulan hemisferle sınırlı kaldığını, karşı hemisferi etkilemediğini gözlemledik. Travma oluşturulan hemisferdeki immüoreaksiyonun, dolayısıyla apoptozisin 24 saatte zirveye ulaştığını, bu yüksekliğin 72 saatten sonra hızla düşmeye başladığını tespit ettik. Posttravmatik oksidatif stresi dolayısıyla apoptozisi azaltmak için melatonin verilen ratlarda apoptozis göstergeçlerinin anlamlı derecede ($P < 0.05$) azaldığını gözlemledik.

Sonuç: Bulgularımıza dayanarak melatoninin travma sonrası oksidatif stresse bağı olarak gelişen apoptozisi dolayısıyla postravmatik sekonder hasarı önleyici bir tedavi için en uygun adaylardan biri olabileceğini, ancak bunun için tek başına veya diğer anti-apoptotik ajanlarla birlikte kombine edilerek kullanıldığı daha ileri çalışmalar gerektiğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Kafa travması, oksidatif stres, apoptozis, melatonin kaspaz, matrix mettalloprotein

8.SUMMARY

THE EFFECT OF MELATONİN ON APOPTOSİS DUE TO EXPERİMENTAL TRAUMATİK BRAİN DAMAGE ON RATS

Scope: This in our study we tried to demonstrate the distribution of indicators of apoptosis in time and location in rats to which we performed experimental focal head trauma. We also tried to demonstrate the decrease of apoptosis indicators by giving melatonin and we searched the effect of oxidative stress on post traumatic apoptosis.

Material and Method: We divided the rats into four groups as control, trauma, trauma+melatonin, trauma+placebo. And then we divided each group into five subgroups. The rats were sacrificed after 12, 24, 72, 120 and 168. hours. We observed the distribution of apoptosis indicators K3, K8, and MMP-9 in time and location.

Results: In our study we also observed that as in many physiopathological processes oxidative stress and apoptosis act together in post traumatic secondary brain injury and we also observed that oxidative stress contributes apoptosis by inducing MMP-9 pathway except caspas, but we also observed that immunoreactives only effect the traumatic hemisphere and don't effect the opposite site. We demonstrated that the immuno reaction and apoptosis in traumatic hemisphere reaches peak level at 24 hours and rapidly slows down after 72 hours. In the rats given melatonin to decrease oxidative stress thus apoptosis, the indicators of apoptosis significantly decrease but doesn't reach zero level.

Conclusion: To our results we concluded that melatonin is one of the most important agents to prevent posttraumatic secondary damage due to oxidative stress-induced apoptosis but further studies are needed fowsing on melatonin as a single or a polytherapeutic agent.

Key Words: Head injury, oxidative stress, apoptosis, caspase, melatonin, matrix mettalprotein

9.KAYNAKLAR

1. Andriessen TM, Horn J, Franschman G, van der Naalt J, Haitsma I, Jacobs B, Steyerberg EW, Vos PE. Epidemiology, Severity Classification, and Outcome of Moderate and Severe Traumatic Brain Injury: A Prospective Multicenter Study. *J Neurotrauma*. 2011; 28: 2019-31.
2. Kahramansoy N, Erkol H, Kurt F, Gürbüz N, Bozgeyik M, Kıyan A. Analysis of trauma patients in a rural hospital in Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2011 May;17(3):231-7.
3. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2010.
4. Dash PK, Kobori N, Moore AN. A molecular description of brain trauma pathophysiology using microarray technology: an overview. *Neurochem Res*. 2004; 29: 1275–1286.
5. Dressler J, Vemuganti R. Apoptosis and gene expression after TBI. *Leg Med (Tokyo)*. 2009; 11 Suppl 1: S54-5.
6. Hausmann R, Biermann T, Wiest I, Tubel J, Betz P. Neuronal apoptosis following human brain injury. *Int J Legal Med*. 2004; 118: 32–36.
7. Shoji H, Kaneko Y, Mabuchi T, Kibayashi K, Adachi N, Borlongan CV. Genetic and histologic evidence implicates role of inflammation in traumatic brain injury-induced apoptosis in the rat cerebral cortex following moderate fluid percussion injury. *Neuroscience*. 2010 Dec 29; 171(4):1273-82.
8. Liou AK, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol*. 2003 Feb; 69(2):103-42.
9. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*. 2011; 21: 472:319-24.

10. Rosenberg GA. Matrix Metalloproteinases in Neuroinflammation. *GLIA*. 2002; 39:279–291
11. Jian Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jul 1; 39(1):71-80.
12. Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., Lipton, S.A. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297, 1186–1190.
13. Eghwurdjakpor PO, Allison AB. Oxidative stress following traumatic brain injury: enhancement of endogenous antioxidant defense systems and the promise of improved outcome. *Niger J Med*. 2010; 19: 14-21.
14. Aladag MA, Turkoz Y, Parlakpınar H, Ozen H, Egri M, Unal SC. Melatonin ameliorates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage correcting imbalance of nitric oxide levels in rats. *Neurochem Res*. 2009; 34: 1935-44.
15. Saveren M. Kafanın Travmatik Hasarları. Altınörs N, Baykaner K, Şekerci Z, Özyurt E, Caner H (Editörler). *Temel Nöroşirürji I' de*. Ankara. Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları. 1997; s.1-10.
16. Valadka AB. Injury to the cranium. In: Mattox KL, Felliciano DV, Moore EE, editors. *Trauma*. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill. 2000; p.377-399.
17. Newcomb JK, Zhao X, Pike BR, Hayes RL. Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. *Exp Neurol*. 1999 Jul; 158(1):76-88.
18. Mustafa AG, Wang JA, Carrico KM, Hall ED. Pharmacological inhibition of lipid peroxidation attenuates calpain-mediated cytoskeletal degradation after traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2011 May; 117(3):579-88.
19. Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2001; 82: 1461–1471.
20. Finnie, J.W. & P.C. Blumbergs. Animal models traumatic brain injury. *Vet. Pathol*. 2002; 39: 679–689.
21. Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int* 2006; 48: 394–403.
22. Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* 2000; 46: 949–956.
23. Bullock R, Zauner A, Tsuji O, Woodward JJ, Young HF. Excitatory amino acid release after severe human head trauma: Effect of intracranial pressure and cerebral

- perfusion pressure changes. In: Nagai H, Kamiya K (Eds.). Proceedings of the 9th International Symposium on ICP and Its Related Problems. Berlin: Springer-Verlag. 1994; p.264-7.
24. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 1; 92(16):7162-6.
 25. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Soc 1998; 75: 199–212.
 26. Gulcin I, Oktay M, Kufrevioglu O.I et al. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L). Ach J Ethnopharm 2002; 79: 325–329.
 27. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine II: Involvement in human disease. Mayo Clin Proc 1988; 63: 390-08.
 28. Ikeda Y, Long DM. The Molecular basis of Brain Injury and Brain Edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990; 27: 1-11.
 29. Schmidley JW. Free Radicals in central nervous system ischemia. Stroke 1990; 21(7):1086-90.
 30. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. T Klin J Med Sci. 2000; 20: 107-111.
 31. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994; 298: 249-58.
 32. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. Am J Kidn Dis. 1994; 24(1):112-29.
 33. Palacios M, Knowles RG, Palmer RJM and Moncada S. Nitric oxide from Larginine stimulates the soluble guany-latecyclase in adrenal glands. Biochem Biophys ResCommun 1989; 165: 802-9.
 34. Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platellet agregasyon by releasing a nitric oxide-like factor. Pros Natl Acad Sci USA.1989; 86: 6328-32.
 35. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. American Journal of Medicine. 2000; 109:150-158.
 36. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. Eur J Pharmacol 1991; 206:163-4.
 37. Haefflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophtalmic artery. Invest Ophtalmol Vis Sci 1992; 33(7):2340-8.

38. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-402.
39. Burnett AL, Lowenstien CJ, Bredt DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992; 257: 401-403.
40. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic dysfunction disease. *Gastroenterology* 1992; 103:1928-1949.
41. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis*. 1994; 24 (1): 112-129.
42. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther(USA)*. 1994; 8(4): 601-610.
43. Stadler J, Billiar TR, Curran RD. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:C910-6.
44. Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 193: 398-405.
45. Ochoa JB, Bernard AC, Mistry SK. Trauma increases extrahepatic arginase activity. *Surgery*. 2000; 127:419-426.
46. Angele MK, Smail N, Knöferl MW. L-Arginine restores splenocyte functions after trauma and hemorrhage potentially by improving splenic blood flow. *American Journal of Physiology*. 1999; 276:C145-C151.
47. Angele MK, Smail N, Wang P. L-arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma-hemorrhage. *Surgery*. 1998; 124:394-402.
48. Laszlo F, Whittle BJR. Endogenous nitric oxide in the maintenance of rat microvascular integrity against widespread plasma leakage following abdominal laparotomy. *British Journal of Pharmacology*. 1999; 126:515-521.
49. H. Öñiz, Apoptosis: The Death Decision, *SSK Tepecik Hast. Derg.* 2004; 14: 1 1-20.
50. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*. 1972; 26, 239–257.
51. S. Öktem, M.H. Özhan, D.Özol, Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*. 2001; 2: 1 91-95.
52. B. Erdoğan, E. Uzaslan, Apoptosis Mechanism: Fas-FasL-Mediated Apoptosis in Tumour Development, *Akciğer Arşivi*. 2003; 4: 1 165-174.
53. F. Öztürk, Apoptoz, *İnönü Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9:2 143- 148.

54. J.J. Cohen, Apoptosis Immunology Today 1993; 14: 3 126-130. 58.
55. R.M. Friedlander, Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases, N. Engl. J. Med. 2003; 348: 14 1365-1375.
56. Liu X Z, Xu X M, Hu R, Du C, Zhang S X, McDonald J W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. The Journal of Neuro Science Vol. 17, NO.14 1997; PP. 5395-5406.
57. H.Parlakpınar, M.Koç, A.Acet, The Effects of Apoptosis and Melatonin Levels on Aging, T. Klin. J. Med. Sci. 2004; 24:1 62-67.
58. G. Roseborough, R. Lin, D. Gao, A. McHale, L. Chen, G.M. Williams, C. Wei, DNA damage and repair in human spinal cord following ischemiareperfusion injury, Journal of Cardiothoracic-Renal Research. 2006; 1:2 141-145.
59. S. Carloni, E. Mazzoni, M. Cimino, M.G. Simoni, C. Perego, C. Scopa, W. Balduini, Simvastatin reduces caspase-3 activation and inflammatory markers induced by hypoxia-ischemia in the newborn rat, Neurobiology of Disease. 2006; 21: 1 119 -126.
60. M. Schuler and D.R. Gren, Mechanisms of p53-dependent apoptosis, Biochem. Soc. Trans. 2001; 29 684–688.
61. M. Ozansoy, A.N. Başak, Programmed Cell Death in Parkinson's Disease, Parkinson Hast. Hareket Boz. Der. 2006; 9: 1 54-61.
62. S.S. Yadav, D. Sindram, D.K. Perry, P.A. Clavien, Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase- Dependent Pathway, Hepatology. 1999; 30: 5 1223-1235.
63. K. Matsushita, Y. Wu, J. Qiu, L. Lang-Lazdunski, L. Hirt, C. Waeber, B. T. Hyman, J. Yuan, and M. A. Moskowitz Fas Receptor and Neuronal Cell Death after Spinal Cord Ischemia, The Journal of Neuroscience. 2000; 20: 18 6879-6887.
64. F. Cheah, M.B. Hampton, B.A. Darlow, C.C. Winterbourn, M.C.M. Vissers, Detection of apoptosis by caspase-3 activation in tracheal aspirate neutrophils from premature infants: relationship with NF-KB activation , Journal of Leukocyte Biology. 2005; 77: 432-437.
65. L. Berliocchi, D. Bano and P. Nicotera, Ca²⁺ signals and death programmes in neurons, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 2005; 360: 1 2255- 2258.
66. I. Budihardjo, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo and X. Wang, Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, Annu. Rev. Cell Dev. Biol.1999; 15 269–290.
67. L. Eckhart, A. Uthman, W. Sipos, and E. Tschachler, Genome Sequence Comparison Reveals Independent Inactivation of the Caspase-15 Gene in Different Evolutionary Lineages of Mammals, Mol. Biol.Evol. 2006; 23: 11 2081-2089.

68. R. Onur, A. Semerciöz, I. Orhan and H. Yekeler, The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele, *Urological Research*. 2004; 32: 3 204-208.
69. G. Baydas, R.J. Reiter, M. Akbulut, M. Tuzcu, S.G. Tamer, Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome C translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels, *Neuroscience* 2005; 135:3 879-886.
70. S.Orrenius, Mitochondrial regulation of apoptotic cell death, *Toxicology Letters* 2004;149:1-3 19-23.
71. E. Sakallı Çetin, N. Özçelik, Apoptotic Mechanism of Mistletoe (*Viscum Album*) Extract Used in the Treatment of Cancer, *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 2007; 27: 1 533-539.
72. Cimpan M.R, Matre R, Cressey L.I, Tysnes B, Lie S.A, Gjertsen B.T, Matre R. The Effect Of Heat And Auto Polymerized Denture Base Polymers On Clonogenicity, Apoptosis, And Necrosis In Fibroblasts: Denture Base Polymers Induce Apoptosis And Necrosis, *Acta Odontol Scand.* 2000; 58: 217-228
73. Majno, g., joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 3-15.
74. N. Yılmaz, S. Pençe, Kaspazlar, *İbni Sina Tıp Dergisi*, 7 2002; 127-145.
75. N.A. Thornberry, The caspase family of cysteine proteases, *British Medical Bulletin*, 1996; 53: 3 478-490.
76. M.A. Moskowitz, D.A. Le, M.J. Whalen, Caspases and upstream mechanisms in central nervous system ischemic injury, *International Congress Series* 2003; 1252 155-161.
77. S. Namura, J. Zhu, K. Fink, M. Endres, A. Srinivasan, K.J. Tomaselli, J. Yuan, and M.A. Moskowitz, Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia, *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 10 3659-3668.
78. J. Chen, T. Nagayama, K. Jin, R.A. Stetler, R.L. Zhu, S.H. Graham, and R.P. Simon, Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia, *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 13 4914-4928.
79. A. Rami, S. Jansen, I. Giesser and J. Winckler, Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localisation, *Neurochemistry International* 2003; 43: 3 211-223.
80. J.E. Springer, R.D. Azbill, S.A. Nottingham, and S.E. Kennedy, Calcineurin-Mediated BAD Dephosphorylation Activates the Caspase-3 Apoptotic Cascade in

Traumatic Spinal Cord Injury, *The Journal of Neuroscience* 2000; 20: 19 7246-7251.

81. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000; 102(16):1874-6.
82. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; 12(12):1075-95.
83. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-4.
84. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49(3):187-98.
85. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99(2):157-66.
86. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8):827-39.
87. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69(6):851-9.
88. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005; 31(6):599-621.
89. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, et al. The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 2002; 41(30):9462-9.
90. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998; 161(7):3340-6.
91. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1):12-24.
92. Hrabec E, Strek M, Nowak D, Greger J, Suwalski M, Hrabec Z. Activity of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in primary pulmonary carcinomas: a quantitative analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128(4):197-204.
93. Hewitt R, Dano K. Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer. *Enzyme Protein* 1996; 49(1-3):163-73.
94. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4):151-60.

95. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14(17):2123-33.
96. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
97. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6(4):121-5.
98. Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. *Agents Actions Suppl* 1991; 35: 69-76.
99. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev* 2004; 9(1):63-79.
100. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23: 406-415.
101. Rosenberg, GA, Navratil, M., Barone, F. & Feuerstein, G. Z. Proteolytic cascade localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis*. 1996 Jan; 14(1):35
102. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997 Oct; 23(5):406-15.
103. Selkoe, D. J. The celi biology of (3-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Celi Biol*. 1998; 8, 447-453
104. J Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH. The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimmunol*. 2005 Feb; 159(1-2):146-54. Epub 2004 Nov 4.
105. Conant K, McArthur JC, Griffin DE, Sjulson L, Wahl LM, Irani DN. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. *Ann Neurol* 1999; 46: 391–398.
106. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase's in brain injury. *J Neurotrauma* 1995; 12: 833-842.
107. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskovvitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of bloodbrain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; 21:7724-7732.
108. Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkovich R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J Immunol* 2001; 167(7):4008-16.

109. 14 Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia*. 1998; Jan;22(1):53-63.
110. Ates O, Cayli S, Gurses I, Yucel N, Iraz M, Altinoz E, Kocak A, Yologlu S. Effect of pinealectomy and melatonin replacement on morphological and biochemical recovery after traumatic brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 2006; Oct;24(6):357-63
111. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237–256.
112. C. Rodriguez, J.C. Mayo, R.M. Sainz, I. Antolín, F. Herrera, V. Martín and R.J. Reiter, Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *Journal of Pineal Research* 2004; 36: 1 1-9.
113. Saija A, Tomaino A, Trombetta D et al. Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *Eur J Pharm Biopharm* 2002; 53: 209–215.
114. O.S. Palaoglu, E. Beskonaklı, Pineal Gland and Aging, *Turkish Journal of Geriatrics* 1998; 1: 1 13-18.
115. A. Çam, M.F. Erdoğan, Melatonin, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2003; 56: 2 103-112.
116. S. Samantaray, E.A. Sribnick, A. Das, V.H. Knaryan, D.D. Matzelle, A.V. Yallapragada R.J. Reiter, S.K. Ray and N.L. Banik, Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats, *Journal of Pineal Research*. 2008; 44: 4 348-357.
117. R.M. Sainz, J.C. Mayo, C. Rodriguez, D.X. Tan, S. Burillo, R.J. Reither, Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells, *Cellular and molecular life sciences, Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; 60: 7 1407-1426.
118. Celik O, Hascalik S, Onal C, Tamser M, Karakas H.M, Güzel Z. Melatonin administration prevents the disruptive effects of traumatic brain injury in ovariectomized rat brain. *Sinir sistemi cerrahisi dergisi*. 2008; 1(2): 101-106
119. J. Leon, D. Acuña-Castroviejo, R.M. Sainz, J.C. Mayo, D. Tan, R.J. Reiter, Melatonin and mitochondrial function, *Life Sciences* 2004; 75: 1 765-790.
120. Cayli SR, Kocak A, Yilmaz U, Tekiner A, Erbil M, Ozturk C, Batcioglu K, Yologlu S. Effect of combined treatment with melatonin and methylprednisolone on neurological recovery after experimental spinal cord injury. *Eur Spine J*. 2004 Dec;13(8):724-32.
121. Greenberg MS. *Handbook of Neurosurgery*, 3. Baskı Greenberg Graphics Inc, 1994; pp;553-556191

122. Bhatia A, Gupta AK. Neuromonitoring in the intensive care unit. I. Intracranial pressure and cerebral blood flow monitoring. *Intensive Care Medicine* 2007; 33(7):1263-1271.
123. Sapolsky RM, Pulsinelli WA. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neuros: Therapeutic implications. *Science* 1985; 229:1397-1400.
124. Rengachary S, Duke D. Increased intracranial pressure, cerebral edema and brain herniation. In Wilkins RH, Rengachary SS(EDS): *Principles of Neurosurgery* New York. 1994; pp 465-482.
125. Garretson HD, McGraw CP, O'Connor C et al. Effectiveness of Fluid Restriction, Mannitol and Furosemide in Reducing ICP. In *Intracranial Pressure V*, Ishii S, Nagai H and Brock M(eds), Springer-Verlag Berlin. 1983; pp:742-745.
126. Wise BL, Chater N. The value of hipertonic mannitol solution in decreasing brain mass and lowerig cerebrospinal-fluid pressure. *J. Neurosurg.* 1962; 19: 1038-1043.
127. Chiolerio RL, de Tribolet N. Sedatives and antagonists in the managment of severely head injured patient. *Acta Neurochir (wien)* 1992; 55: 43-46.
128. McGill WA. Anesthesia, in Eichelberger MR(ed): *Pediatric Trauma: Prevention*, 1992.
129. Rosner MJ. Pathophysiology and management of increased intracranial pressure. In: Andrews BT(Ed): *Neurosurgical intensive care. International edition.* McGraw-Hill, Inc. pp. 1994;57-112.
130. Marmarou A, Foda MAA-E. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neusurg.* 1994; 80: 301-313.
131. Beer R, Franz G, Krajewski S et alTemporal and spatial profile of caspase 8 expression and proteolysis after experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2001; 78: 862–873.
132. Casey PA, McKenna MC, Fiskum G, Saraswati M, Robertson CL Early and sustained alterations in cerebral metabolism after traumatic brain injury in immature rats. *J Neurotrauma* 2008; 25: 603–614.
133. Gobbel GT, Bonfield C, Carson-Walter EB, Adelson PD Diffuse alterations in synaptic protein expression following focal traumatic brain injury in the immature rat. *Childs Nerv Syst* 2007; 23: 1171–1179.
134. von Baumgarten L, Trabold R, Thal S, Back T, Plesnila N. Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1353–1360.

135. Kabadi SV, Maher TJ. Posttreatment with uridine and melatonin following traumatic brain injury reduces edema in various brain regions in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1199 105–113.
136. Oliveira S, Ximenes VF, Livramento JA et al. High concentrations of the melatonin metabolite, N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine, in cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. *J Pineal Res* 2005; 39: 302–306.
137. Reiter RJ, Tan DX, Sainz R et al. Melatonin reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1299–1321.