

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı

**SİYATİK SİNİRİN FARKLI HASAR MODELLERİNDE
MELATONİN UYGULAMASININ SİNİR REJENERASYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ULTRASTRÜKTÜREL VE
BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ**

Yasemin KAYA

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİRİN FARKLI HASAR MODELLERİNDE
MELATONİN UYGULAMASININ SİNİR REJENERASYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ULTRASTRÜKTÜREL VE
BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ**

**Yasemin KAYA
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje no:2010.02.0122.015).

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir./...../2011

- Tez danışmanı** : Doç. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Nurettin Oğuz
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Muzaffer Sindel
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Bikem Süzen
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
- Üye** : Prof. Dr. Mutay Aslan
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2011 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sinir ezisi, kesisi ve greftleme gibi pek çok yaralanma modelleri üzerinde melatoninin nöroprotektif etkileri çalışılmıştır. Ancak, melatoninin 50 mg/kg/gün dozunda hem sinir ezisi hemde sinir kesisi rejenerasyonu üzerine olan koruyucu etkisini değerlendirip karşılaştıran araştırmalar literatürde azdır. Çalışmamızda, siyatik sinirde kesi ve ezi hasarı sonrası, rejenerasyonu artırma potansiyeli olan melatoninin etkisinin araştırılması ve melatoninin dejenerasyon görülen alanlarda olumlu etkisinin olacağı hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 90 tane *Rattus norvegicus* dişi Wistar sıçan kullanılmış ve denekler altı gruba ayrılmıştır. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sham, Grup 3: Kesi, Grup 4: Kesi + melatonin, Grup 5: Ezi, Grup 6: Ezi + melatonin). Birinci postoperatif günden itibaren altı hafta boyunca saat 16:00-17:00 arasında günde bir kez melatonin, 50 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Siyatik sinir rejenerasyonu, yürüme pattern analizi, pinch, elektrofizyolojik testler, ışık ve elektron mikroskopi analizleri yapılmış ve melatoninin olası antioksidan etkisi biyokimyasal testlerle değerlendirilmiştir. Preoperatif dönemde yürüme pattern analizi sonucunda elde edilen siyatik fonksiyon indeksi (SFI) değerlerinde deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). 3. ve 4. postoperatif haftada, grup 3 ve 4, grup 5 ve 6 arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Pinch test sonucunda kontrol ve sham gruplarında geri çekme refleksine tam yanıt (Grade 3) alınmıştır. Grup 4 ve 6'da geri çekme refleksine tam yanıt (Grade 3) 3. haftada alınmıştır. Aynı haftada bu reflekse tam yanıt grup 5'de grup 6'ya kıyasla çok daha düşük sayıdaki denekte alınmıştır. Buna karşın, grup 3'de bulunan deneklerin hiçbirinden tam bir geriçekme yanıtı (Grade 3) alınmamıştır. Elektron mikroskopik değerlendirme sonucunda grup 4 ve 6'da, grup 3 ve 5'e kıyasla daha az oranda fagositik aktivite gösteren hücre infiltrasyonu ve yeni oluşmaya başlamış ince myelin kılıflara sahip çok sayıda myelinli sinir lifi tespit edilmiştir. Elektrofizyolojik analiz sonucunda sham grubu ile karşılaştırıldığında grup 3 ve 5'in tüm somatosensoriyel uyarılmış potansiyel (SEP) bileşenlerinin (P1, N1, P1, N2) latenslerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Grup 4 ve 6'nın tüm SEP bileşenlerinin latensleri karşılaştırıldığında latenslerin, grup 3 ve 5'e göre anlamlı düzeyde kısaldığı tespit edilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Biyokimyasal analiz sonucunda, melatonin tedavisi uygulanan kesi ve ezi gruplarının doku Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerinin değerleri, kesi ve ezi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.001$) artarken, doku tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin (TBARS) değerleri ise azalmıştır.

Anahtar kelimeler: Siyatik sinir, yaralanma, melatonin

ABSTRACT

Several kinds of injury models, such as crush, cut and graft repair have been well studied in terms of neuroprotective effect of melatonin. However, definitive experimental studies are lacking on neuroprotective effect of melatonin (50 mg/kg/day) in both cut and crush injuries. In the present study, our aim was to study the effect of melatonin on recovery of the sciatic nerve after cut or crush injuries. A total number of 90 Wistar rats were used for this purpose and divided into six groups (Group 1: Control, Group 2: Sham-operated, Group 3: Cut, Group 4: Cut + melatonin, Group 5: Crush, Group 6: Crush+ melatonin). After operation, melatonin administration was performed from the first to the end of the sixth postoperative week between 16:00-17:00. Sciatic nerve regeneration was evaluated by walking track analysis, pinch test, light and electron microscopy and antioxidant effect of melatonin was evaluated by biochemical analysis. In the preoperative day, SFI values of the experimental groups showed no significant difference ($p>0.05$) compared with the control group. However there was statistical significance between group 3, 4 and group 5, 6 in the 3rd and 4th postoperative weeks ($p<0.05$). In control and sham-operated groups withdrawal responses to pinch were full (Grade 3). The onset day of full withdrawal response (Grade 3) to pinch stimulation was in the 3rd postoperative week. At the same week, number of the animals of group 5 showing withdrawal was higher than those in group 6. In spite of that group 3 had no full response in the 3rd postoperative week. Electron microscopic analysis revealed more less phagocytic cells and lamellar separation of the myelin sheaths in animals administered Melatonin than those of sciatic nerve injury performed. As a result of electrophysiologic analysis revealed that components P1, N1, P2 and N2 were significantly ($p<0.001$) increased in group 3 and 5 compared with the Sham group and these components were also prolonged in the Group 4 and Group 6 with respect to the group 3 and 5 ($p<0.001$). Biochemical analysis showed that treatment with melatonin in both crush and cut injury groups induced a significant increase in tissue MDA levels, but a decrease in tissue SOD, CAT, GPx activities ($p<0.001$).

Key words: sciatic nerve, injury, Melatonin

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2. 1.	Periferik sinir anatomisi
2. 1. 1.	Siyatik sinir anatomisi
2. 2.	Periferik sinir yaralanması
2. 2. 1.	Periferik sinir hasarının sınıflandırılması
2. 2. 2.	Sinir dejenerasyonu ve rejenerasyonu
2. 2. 2. 1.	Hücre gövdesi
2. 2. 2. 2.	Proksimal akson parçası
2. 2. 2. 3.	Büyüme konisi ve yolu
2. 2. 2. 4.	Hasar alanı
2. 2. 2. 5.	Distal akson parçası
2. 2. 2. 6.	Kaslar
2. 2. 2. 7.	Sinir tamiri
2.3.	Pineal bez
2.4.	Melatonin
2.4.1.	Melatoninin sentez ve metabolizması
2.4.2.	Melatonin sentezinin düzenlenmesi
2.4.3.	Melatoninin görevleri
2. 4. 3. 1.	Sirkadian ritm düzenlenmesi
2. 4. 3. 2.	Antioksidan özellikleri
2. 4. 3. 3.	Endokrin etkileri
2. 4. 3. 4.	İmmün sistem üzerindeki etkileri
2. 4. 3. 5.	Onkostatik etkileri
2. 4. 3. 6.	Termoregülatör etkileri
2. 4. 3. 7.	Hücre koruyucu etkileri
2. 4. 4.	Melatoninin klinikte kullanımı
2. 4. 5.	Melatoninin vücuttaki etki mekanizmaları
2. 5.	Serbest radikaller
2. 5. 1.	Serbest radikal oluşumu ve reaktif oksijen türleri
2. 5. 1. 1.	Süperoksit radikali
2. 5. 1. 2.	Hidrojen peroksit

2. 5. 1. 3.	Hidroksil radikali	18
2. 5. 1. 4.	Singlet oksijen	19
2. 5. 1. 5.	Nitrik oksit	19
2. 5. 2.	Serbest radikal kaynakları	19
2. 5. 3.	Serbest radikallerin etkileri	20
2. 5. 3. 1.	Membran lipidlerine etkileri	21
2. 5. 3. 2.	Proteinlere etkileri	21
2. 5. 3. 3.	Nükleik asitler ve DNA' ya etkileri	21
2. 6.	Antioksidan savunma sistemleri	21
2. 6. 1.	Enzimatik antioksidanlar	22
2. 6. 1. 1.	Süperoksit dismutaz (SOD)	22
2. 6. 1. 2.	Glutasyon peroksidaz (GPx)	23
2. 6. 1. 3	Katalaz	23
2. 6. 2.	Enzimatik olmayan antioksidanlar	23
2. 6. 2. 1.	C Vitamini	23
2. 6. 2. 2.	E Vitamini	24
2. 6. 3.	Antioksidan etki tipleri	24
2. 7.	Somatosensoriyel korteks ve somatosensoriyel uyarılma potansiyelleri	24
2. 7. 1.	Somatosensoriyel korteks	24
2. 7. 2.	Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller	27
MATERYAL VE METOT		30
3. 1.	Denekler	30
3. 2	Deney grupları	30
3. 3	Cerrahi işlemler	30
3. 4.	Melatonin uygulaması	31
3. 5.	Değerlendirme testleri	32
3. 5. 1	Motor fonksiyon testi (Yürüme patern analizi)	32
3. 5. 2.	Duyusal fonksiyon testi (Pinch test)	32
3. 5. 3	Elektrofizyolojik değerlendirme	32
3. 5. 3. 1	Somatosensoriyel uyarılma potansiyellerinin kaydedilmesi	32
3. 6.	Deneklerin sakrifiyonu	33
3. 7	Ultrastüktürel değerlendirme	33
3. 7. 1.	Elektron mikroskopik inceleme	33
3. 8.	Biyokimyasal değerlendirme	33
3. 8. 1.	Lipid peroksidasyon seviyelerinin ölçümü	33
3. 9.	Antioksidanların tayini	34
3. 9. 1	Katalaz enzim aktivite tayini	35
3. 9. 2	Glutasyon peroksidaz enzim aktivite tayini	35
3. 9. 3.	Süperoksit dismutaz aktivite tayini	36
3. 10.	Veri analizi	36
BULGULAR		37
4. 1.	SFI değerleri	37
4. 2.	Pinch test bulguları	38
4. 3.	Işık ve elektron mikroskopik değerlendirme	39
4. 4.	Elektrofizyolojik analiz	40

4.5.	Biyokimyasal değerlendirme	42
TARTIşMA		50
SONUÇLAR		53
KAYNAKLAR		54
ÖZGEÇMİş		62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

	Sayfa
NGF : Nerve Growth Factor	7
IL : İnterlökin	7
NCAM : Nöral Hücre Adezyon Molekülü	8
GAPs : Growth Associated Protein	8
RHT : Retinohipotalamik traktus	11
SKÇ : Suprakiazmatik çekirdek	11
SSG : Ganglion cervical superior	11
AANAT : N-asetiltransferaz	12
NAS : N-asetilserotonin	12
HIOMT : N-asetilserotonin hidroksiindol-O-metiltransferaz	12
5-HT : 5-hidroksitriptamin	12
cAMP : Siklik adenosin monofosfat	12
PKC : Protein kinaz C	12
HOCI : Hipoklorik asit	13
O₂^{•-} : Süperoksit radikali	13
ONOO⁻ : Peroksinitrit anyonu	13
OHOOH : Peroksinitröz asit	13
AFMK : 3-hidroksimelatonin N1-asetil-N2-formil-5-methoksikiynuramin	13
AMK : N-asetil-5-methoksikiynuramin	13
INF-g : İnterferon gamma	14
NK : Doğal öldürücü (Natural Killer) hücreler	14
MCF-7 : İnsan meme adenokarsinom hücre serisi	14
MT1 : Tip1 Melatonin reseptörü	15
MT2 : Tip 2 Melatonin reseptörü	15
NO : Nitrik oksit	17
NO₂ : Azot dioksit	17
H₂O₂ : Hidrojen peroksit	17
•OH : Hidroksil radikali	18
Fe⁺³ : Ferri demir	18
Fe⁺² : Ferro demir	18
PUFA : Poliansatüre yağ asitleri	21
HNE : Hidroksinonenal	21
SOD : Süperoksit dismutaz	22
CAT : Katalaz	23
GPx : Glutasyon peroksidaz	23
C₆H₈O₆ : C vitamini (askorbik asit)	23
S-I : Sekonder somatosensoriyel korteks I	25
S-II : Sekonder somatosensoriyel korteks II	26
SEP : Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller	27
SFI : Siyatik fonksiyon indeksi	32

TEM	: Transmision Elektron Mikroskop	33
TEMGA	: Tıp Fakóltesi Elektron Mikroskopik Görüntü Analiz Ünitesi	33
OsO₄	: Osmium tetraoksit	33
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri	34
MDA	: Malondialdehit	34
TBA	: 2-tiyobarbitürik asit	34
HCl	: Hidroklorik asit	34
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Myelinli bir nöronun yapısı	3
2.2.	Bir sinir lifi (akson) ve Schwann hücresi kesiti ve miyelin kılıfın gelişmesi	3
2.3.	Myelinli ve myelinsiz bir periferik sinir yapısı	4
2.4.	Rat siyatik sinirinin önden görüntüsü	5
2.5.	Periferik sinir kesisi sonrası rejenerasyon süreçleri	7
2.6.	Büyüme konisi	9
2.7.	Melatoninin kimyasal yapısı	12
2.8.	Melatonin sentezinin düzenlenmesi	13
2.9.	Somatosensoriyel korteks	26
2.10.	SEP'lerin yolları	28
3.1.	Kesi grubu cerrahi işlem öncesi ve sonrası	31
3.2.	Ezi grubu cerrahi işlem öncesi ve sonrası	31
3.3.	Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilecek olan ölçümler	32
4.1.	Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri	37
4.2.	Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Grade 3) gösteren denek sayıları	38
4.3.	Işık ve Elektron mikroskopi bulguları	40
4.4.	Plazma katalaz enzimi aktivite değerleri	42
4.5.	Doku katalaz aktivite değerleri	43
4.6.	Plazma GPx enzimi aktivite değerleri	44
4.7.	Doku GPx enzimi aktivite değerleri	45
4.8.	Plazma SOD enzimi aktivite değerleri	46
4.9.	Doku SOD enzimi aktivite değerleri	47
4.10.	Plazma TBARS değerleri	48
4.11.	Doku TBARS değerleri	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1	Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması	6
3.1	Deney grupları	30
4.1	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP latensleri (ms)	41
4.2	Kontrol ve deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP genlikleri (μ V)	41
4.3	Plazma katalaz enzim aktivite miktarı	42
4.4	Doku katalaz enzimi miktarı	43
4.5	Plazma GPx enzim miktarı	44
4.6.	Doku GPx enzim miktarı	45
4.7.	Plazma SOD enzim miktarı	46
4.8	Doku SOD enzim miktarı	47
4.9	Plazma TBARS miktarı	48
4.10	Doku TBARS miktarı	49

GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinirler, canlılarda duyu ve motor fonksiyonların sürdürülmesinde görev yapan en önemli yapılardır. Periferik sinirlerde oluşabilecek hasarlar, bu işlevlerin kısmen ya da tam olarak ortadan kalkması ile sonuçlanır. Acil servise başvuran hastaların %2'sinde, periferik sinir hasarı meydana gelmektedir. Periferik sinir kesisi sonucu yapılan standart cerrahi onarımlara rağmen, çoğu zaman tam bir fonksiyonel iyileşme elde edilmez [1]. Bu sorunun önlenmesine yönelik birçok cerrahi teknik denenmesine rağmen, periferik sinirin rejenerasyonuna etki edebilecek ilaçlar konusunda yapılmış deneysel çalışmalar azdır [2, 3].

Periferik sinir rejenerasyonun klinik sonuçlarını etkileyen çeşitli nedenler vardır. Onarım hattında oluşan iske mi ve devamındaki inflamatuvar süreçte, yaralanma bölgesinde başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere, toksik etkili birçok ajan birikir [4, 5]. Sonuçta membran permeabilitesi bozulur ve hücre içine kalsiyum akışı başlar. Hücre içinde kalsiyum iyonunun artması proteolitik enzimleri aktive ederek, nörofilament ve mikrotübülleri de kapsayan hücre yapı taşlarının yıkımına neden olur [6, 7].

Periferik sinir kesileri sonrası hücre gövdesinde görülen kromatolitik değişiklikler iyi bilinmektedir. Bu değişiklikler sinir kesisini takiben 1 ile 3 hafta arasında oluşmaktadır ve periferik nöronlarda ölüm olmadığı ve denervasyonun yaralanma sonrası ilk 5 hafta içerisinde olduğu bildirilmektedir [8].

Periferik sinir iyileşmesini tam olarak anlamak için hasarın tam olarak anlaşılması yani, hasar sonrası dönemde sinir ve çevre dokularda oluşan değişikliklerin morfolojik ve moleküler düzeyde bilinmesi gereklidir. Bu amaçla yönelik olarak sinir hasarını simüle etmek üzere çeşitli deney hayvanlarında farklı sinir hasarı modelleri oluşturulmuştur. Bu deney modellerinin birbirlerinden farklılığı hasarın oluşturulma yeri, şiddeti, biçimi ve süresidir. Periferik sinir hasarı oluşturmak için ezi [9, 10], kesisi [11], termal hasar [12], nörotoksik maddeler [13, 14] ve iske mi [15] gibi modeller kullanılmaktadır. Bu modeller içerisinde en çok kullanılanları; siyatik sinirin tam kesisi ve ezisidir [16].

Melatonin iskemik rejenerasyon sırasında nöronda yeni liflerin oluşumunu arttırdığının ve myelin kılıftaki ödemi azalttığının görülmesi araştırmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur.

Melatonin lipid peroksidasyonunu ve oksidatif mitokondriyal hasarı azaltarak ayrıca antioksidan olan diğer enzimlerin salınımı stimüle ederek infarktli bölgeyi sınırlar. Ek olarak, infarktli bölgede ödemi de azaltır. Çalışmalar melatonin iskemik hasara maruz kalmış periferik sinirde de

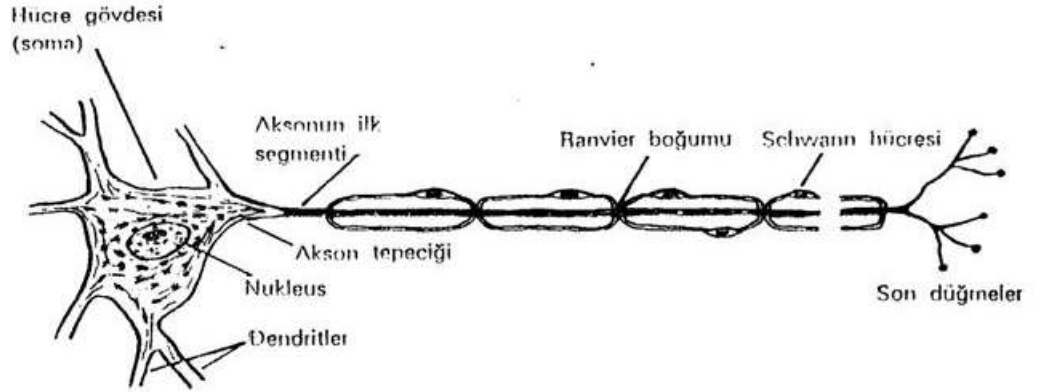
nöroprotektif etkileri olduğunu göstermiştir. Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan siyatik sinir kesisini takiben verilen melatoninin rejenerasyonu hızlandığı tespit edilmiştir [17].

Çalışmamızda amacımız sinir kesisi ve ezisi sonrası melatoninin etkisinin olup olmadığını ultrastrüktürel, elektrofizyolojik, fonksiyonel ve biyokimyasal düzeyde araştırmaktır.

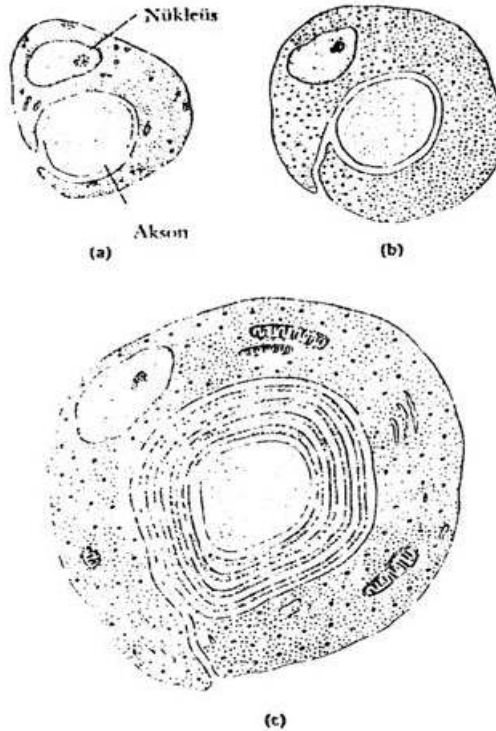
GENEL BİLGİLER

2.1.Periferik Sinir Anatomisi

Sinir sisteminin yapıtaşı olan nöronlar, bir sinir hücresi ile bundan çıkan akson ve dendritlerden oluşmuştur. Bir sinir hücresinin ışık mikroskobu ile incelenmesinde ortada oval ya da yuvarlak bir çekirdek gözlenir. Nöroplazma olarak adlandırılan stoplazması içinde iplikçik, membran ve granüller yapıda nörofibril, Nissl maddesi, Golgi kompleksi ve mitokondri gibi çeşitli organeller bulunur. Şekil 2. 1’de ve Şekil 2. 2’de miyelinli bir motor nöronun yapısı ve enine kesiti görülmektedir.

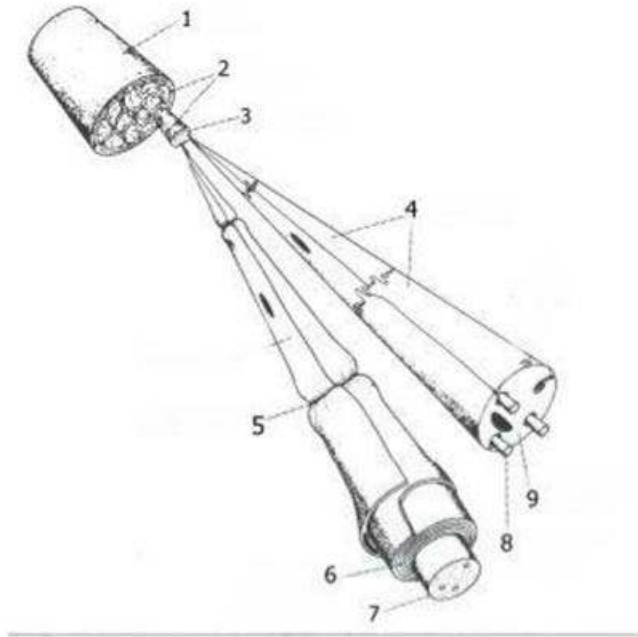


Şekil 2.1.Miyelinli bir nöronun yapısı [18].



Şekil 2.2.Bir sinir lifi (akson) ve Schwann hücresi kesiti. (b) ve (c) myelin kılıfın gelişmesi [18].

Yarı jel kıvamında olan nöroplazmadan aksona doğru devamlı bir sıvı akışı vardır ve akson içindeki sıvı aksoplazma adını alır. Aksoplazma çevredeki yapılardan aksolemma denilen ve ancak elektron mikroskopuyla görülebilen bir membranla ayrılır. Akson tepeciğinden başlayan akson, sinir hücre resini terk ettikten sonra myelinli ya da myelinsiz olmak üzere iki şekilde görülebilir. Myelinli sinir liflerinde sinir hücresinden sonra kısa bir uzaklık çıplak olarak devam eder. Daha sonra aksonun çevresinde, konsantrik olarak sıralanmış lipid ve protein karışımından oluşan miyelin kılıfı bulunur. Myelin kılıfı devamlı değildir; Ranvier boğumlarında kesintiye uğrar ve bu bölgelerdeki 1 mikronluk aralıkta miyelin kılıfı bulunmaz. Sinir lifinin iki Ranvier boğumu arasındaki kısmına internod denir. Myelin kılıfı, Schwann hücresi membranının akson etrafında kıvrılmasıyla oluşmuştur. Schwann hücresinin en dıştaki membranına ise nörolemma ve ya Schwann kılıfı denir ki, bunun hemen altında ince bir tabaka stoplazma ile hücrenin çekirdeği bulunur. Her bir sinir lifi merkezî sinir sisteminden ve ya periferdeki gangliyondan çıktıktan sonra endoneurium adı verilen, fibröz yapıda ince bir membranla kaplanır (Şekil 2. 3) Birçok sinir liflerinden oluşan sinir demetleri, yine fibröz bir kılıf olan, epineurium ile kaplıdır [18, 19, 20].



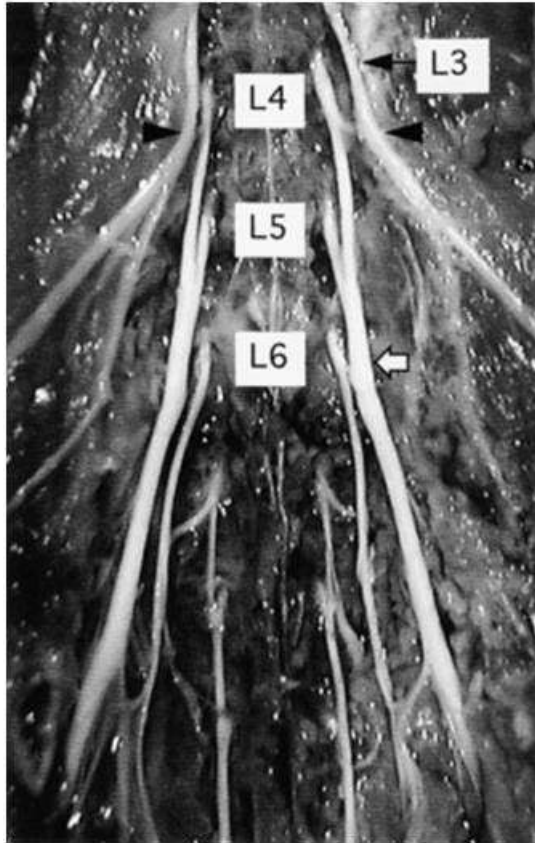
Şekil 2.3. Myelinli ve myelinsiz bir periferik sinir yapısı. 1-Epineurium, 2- Perineurium, 3- Endoneurium, 4- Schwann hücresi, 5- Ranvier boğumu, 6- Myelin kılıfı, 7- Myelinli akson, 8- Myelinsiz akson, 9- Schwann hücresi sitoplazması [21].

Periferik sinirler, dorsal kök ganglionlarındaki sensorial, omurilikteki motor ve postganglionik otonomik nöronların periferik uzantılarının oluşturduğu yapılardır [22]. Sinir lifleri, afferent veya efferent aksonlar içeren miyelinli ya da miyelinli sinir lifi demetlerinden oluşan ve çevresi bağ dokusu kılıflarla sarılı oluşumlardır [23, 24].

Nöronların uzantıları bir araya gelip üzeri kollajenden zengin bir kılıfla kaplanarak fasikülleri oluştururlar. Fasiküller de bir araya gelip daha gevşek kollagen içeren bir kılıfla sarılarak periferik sinir haline gelir. Fasiküllerin içindeki her bir nöronal uzantı fasikül içerisindeki seyri sırasında sık sık yer değiştirerek, aynı komşu lifin, kendi elektriksel uyarımlarından etkilenmesini engeller. Fasiküller de seyirleri esnasında yer değiştirerek ve birbirlerine dallar vererek ağ şeklinde bir yapı oluştururlar [22].

2.1.1.Siyatik Sinir Anatomisi

Lumbal pleksus L4 ve L5 lumbal sinirlerden, sıklıkla T13 ve L3'den dallar alarak oluşmaktadır. Sakral pleksus 5, 6 ve kısmen 4. lumbal sinirler tarafından oluşturulur. Bu sinirlerin dalları lumbo-sakral gövdeyi oluşturur [25]. Sakral pleksus pelviste orijinlerine göre anterior ve posterior olmak üzere 2 sinire ayrılır. Posterior dalı siyatik sinirdir (n. ischiadicus). Siyatik sinir n. tibialis, n. peroneus communis adı verilen terminal dallara sahiptir [26].



Şekil 2.4.Rat s iyatik s inirinin ö nden gö rüntüsü. L4 ve L5 spinal sinirler birleşip siyatik siniri oluşturmaktadır. L6 spinal sinir siyatik sinire solda ince bir dal vermektedir. (beyaz ok). (Siyah ok) L4 ve L3 spinal sinirlerin ince birleşimi görülmektedir [25].

2.2.Periferik Sinir Yaralanması

Periferik sinirler, mekanik travmadan (bası, gerilme, şiddet) etkilenebilecekleri gibi termal, iskemik ve kimyasal etkenler gibi çok değişik etkenler ile yaralanabilirler. Fakat bu yaralanmaların en sık olanı travmatik yaralanmalardır. Periferik sinir yaralanmaları hayati tehlike oluşturmamalarına

rağmen sonuçta kişinin fonksiyonlarını ileri derecede kısıtlayabilmesi, sosyo-ekonomik ve psikolojik durumunu etkilemesi açısından önemlidir. Periferik sinir yaralanması sonrası istenilen amaç sinir iyileşmesinin en kısa sürede sağlanmasıdır. Bu iyileşmenin hızlı ve istenilen şekilde olması hasar tipi, derecesi ve uygulanan tedaviye bağlıdır. Periferik sinir hasarı, uygulanan kompresyonun süresine ve kuvvetine göre değişkenlik gösterir. Fazla miktarda bir bağ dokusu ile sarılı çok sayıda fasikül içeren sinirler, az miktarda bağ dokusu ile sarılı tek fasikül i çeren sinirlere göre da ha az kom presyondan e tkilenir. Sinir iç indeki fasiküllerin yerleşimine göre de değişiklik gösterir. Büyük lifler küçük liflere göre kompresyon ve iskemiye daha fazla duyarlıdır. Ayrıca yüzeysel yerleşimli fasiküller derin yerleşimli olanlara oranla daha fazla kompresyona duyarlıdır. Ayrıca, kalın perineurium içine gömülü küçük lifler, ince p erineurium iç ine gömülü kalın liflere oranla daha az kompresyona duyarlıdır [27, 28, 29].

2.2.1.Periferik Sinir Hasarının Sınıflandırılması

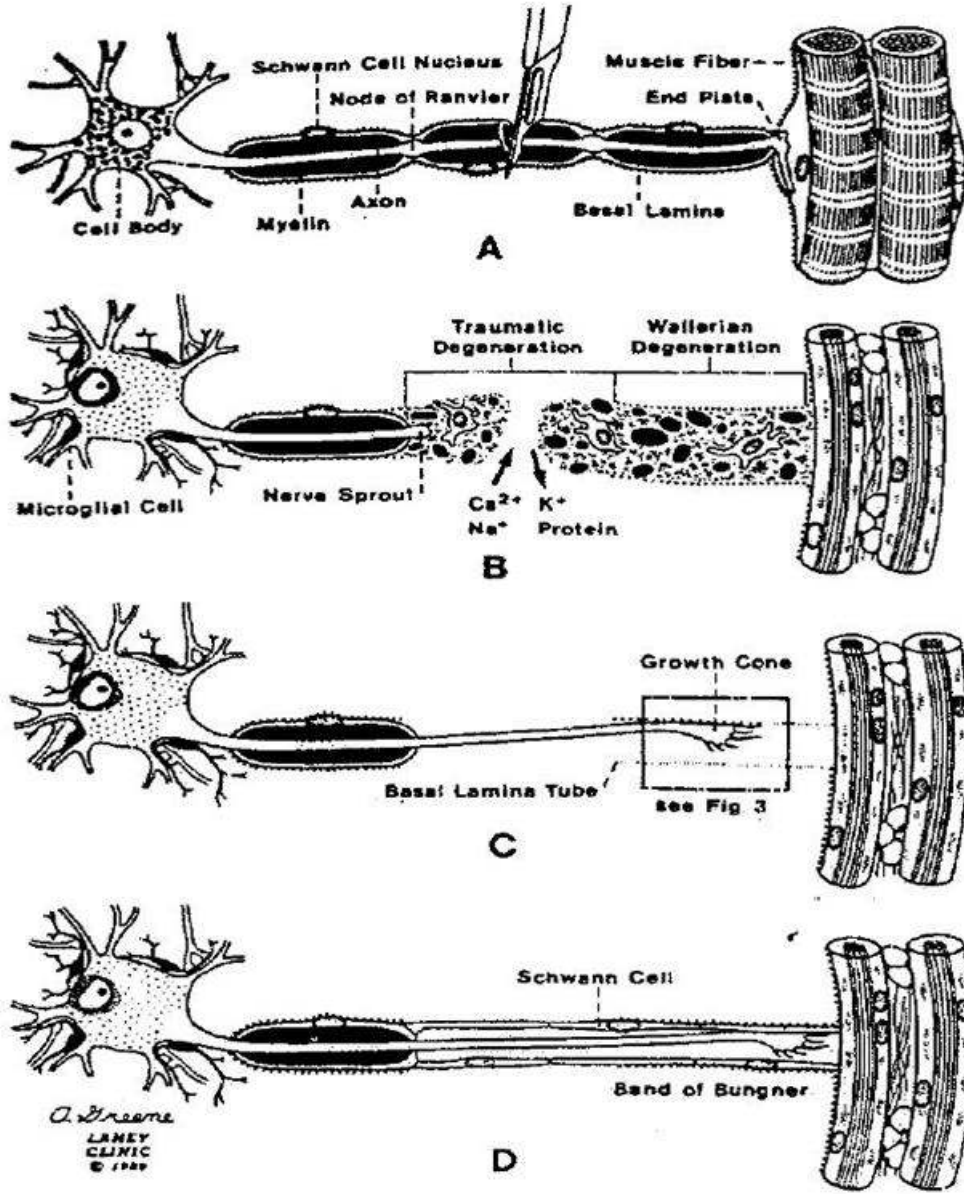
1941 yılında Cohen periferik sinir hasarını klinik olarak üç grupta sınıflandırmış ve Seddon 1947 yılında bu sınıflandırmayı 650 hastada yaptığı çalışmalarla popüler hale gelmiştir. Sunderland 1951 yılında Seddon'un popülerize ettiği sınıflandırmayı geliştirerek beş sınıfta incelemiştir ve bug ün kullanılan sınıflandırma oluşturulmuştur. 1988 yılında Mackinnon, Sunderland'ın sınıflandırmasına altıncısını da eklemiştir [30]. Yaralanmanın derecesinin bilinmesi tedavinin planlanması açısından önemlidir. Birinci, ikinci ve üç üncü derece yaralanmalarda geri dönüş olduğu, cerrahiye gerek olmadığı, dördüncü ve beşinci derece yaralanmalarda ise cerrahisiz geri dönüş olmadığı bildirilmiştir. Altıncı derece yaralanmalarda ise geri dönüşün değişik derecelerde olabildiği rapor edilmiştir [31].

Tablo 2.1.Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması.

SEDDON	SUNDERLAND
Nöropraksia	1. derece yaralanma Segmental demiyelinizasyon, lokalize iletim bloğu
Aksonotimezis	2. derece yaralanma Aksonal yaralanma, distalde
	3. derece yaralanma Waller dejenerasyonu
	4. derece yaralanma Waller dejenerasyonu ve endoneuriumda fibrozis ile birliktedir
Nörotimezis	5. derece yaralanma İntakt olan tek yapı eksternal epineuriumdur.
	6. derece yaralanma Sinir tamamen ayrılmıştır.

2.2.2.Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Bir sinir hü cresine ait aksonun kesilmesi durumunda; proksimal ve distal akson segmentleri ile hü cre gövdesinde bir takım dejeneratif değişiklikler meydana gelmektedir [32]. Bir akson kesildiğinde ve bütünlüğünü kaybettiğinde distal parça Waller dejenerasyonuna uğrar [30]. Olayın başlangıcı kesi sonrası 48-96 saattir [27, 28, 30].



Şekil 2.5. Periferik sinir kesisi sonrası rejenerasyon süreçleri. A- Sinir kesisi sonrası hücre gövdesindeki değişiklikler, B- Travmatik ve Waller dejenerasyonu, C- Büyüme konisi oluşumu, D- Büyüme konisinden gelişen sinir liflerinin Schwann hücresi tarafından miyelin kılıf ile sarılması [33].

Waller dejenerasyonunda, miyelinin primer fagositozunun çoğu dolaşımdan gelen makrofajlar tarafından oluşturulur. Makrofajlar, yaralanma sonrası 2-3 günde endoneuriumda sayıca belirgin olarak artarlar [32]. Schwann hücresi, NGF (Nerve Growth Factor) oluşturmaya ve güçlü bir uyarın olan IL-1 (İnterlökin-1) salgılamaya devam eder. Makrofajlar ve Schwann hücreleri miyelin yıkımına devam ederler. İlk olarak miyelin, ovoidlere sonra disorganize helezonlara dönüştürülerek Schwann hücre tüpünden ayrılır. Schwann hücreleri, metabolik olarak aktif hale gelirler ve proliferasyona başlayarak yine orijinal hücre tüpü içinde “Büngner Bantları” olarak anılan devamlı hücre zincirleri

oluştururlar [27, 28]. Schwann hücreleri, rejenere olan aksonlarla temas etmesi için yüzeylerinde ekspresyon için NGF ve reseptörünü sentezler. Aynı zamanda IL ve NCAM (Nöral Hücre Adhezyon Molekülü)'da sentezlenmeye devam eder. Bu adhezyon molekülleri, akson uzaması için uygun yüzey sağlar. Diğer hücresel değişiklikler ise endonöral kapillerlerde geçirgenlikte artış, endonöral ödem oluşumu, kan-sinir bariyerinin bozulması ve endonöral fibroblastların proliferasyonunu içerir [32]. Periferik sinir dejenerasyonu ve dejenerasyon sürecinde gelişen olayları daha iyi anlamak için periferik sinirin çeşitli kısımlarında oluşan olayları detaylı bir şekilde açıklamak daha yararlı olacaktır.

2.2.2.1.Hücre Gövdesi

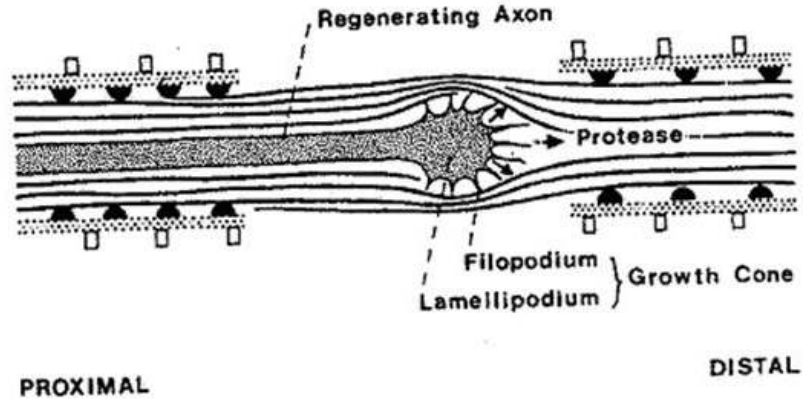
Aksotomi sonrasında nöron şişer, Nissl maddesi dağılır ve nükleus periferik bir görünüm kazanır [27, 28, 30]. Bu sırada nükleusun yeni mRNA ve bu sayede aktin, tubulin gibi hücre iskeletini oluşturan proteinleri üretmesi gerekir. Aksotomi sonrası üretimi arttıran protein grubu GAPs (Growth Associated Protein) adı ile anılır. GAPs üretimi aksotomi sonrası yaklaşık olarak 100 katına çıkar. Büyüyen ve rejenere olan nöral membranın iç yüzeyinde bulunan ve aksonal transportu sağlayan bu fosfo-proteinler, proteinkinaz C'nin substratını oluştururlar ve büyüme bölgesinin ilerlemesinde rol alırlar [27, 28, 30].

2.2.2.2.Proksimal Akson Parçası

Kesilen aksonlar, yaralanma sonrası birkaç saat içinde rejeneratif filizler oluştururlar. Filizler, sağlam bulunan en distaldeki Ranvier boğumundan köken alırlar. Rejenerasyon üniteleri her aksondan birkaç kollateral filiz şeklindedir. Sonuçta birkaç ay içinde sinir kesiti ve tamiri sonrasında distal parçadaki miyelinli akson sayısı 1,5-5 kat artar. Tek bir rejenere olan üniteden çıkan çok sayıdaki filizler distal parçada farklı ve genelde uygun olmayan Schwann hücre tüpleri içerisinde ilerlerler. Bir kez bu yol içerisinde ilerlemeye başladıklarında geriye dönüş yoktur. Tek bir motor nöron farklı kas gruplarına innervasyon sağlayabildiği gibi tek bir duyu nöronu da çeşitli alanlardan duyu alabilir [27, 28, 30].

2.2.2.3.Büyüme Konisi ve Yolu

Rejenere olan aksonun en distali, büyüme ucu ve koniştir. Büyüme konisinin çevreyi algılama, bilgiyi işleyerek aksonu en uygun ortama yönlendirme yeteneği vardır. Filopodiumlar, parmaklı çıkıntılardır ve aktif olarak genişlerler. Lamellipodlar, membranın daha büyük genişlemeleridir. Bu çıkıntılar, büyüme konisinin tabanında mikrotübüllerle desteklenen aktin filamanları üzerinde uzanırlar [33].



Şekil 2.6.Büyüme konisi. Filopod ve lamellipod proteaz, büyüme konisi tarafından oluşturulur ve matriks içerisinde ilerlemeyi kolaylaştırır [33].

Büyüme konisi, dört grup faktöre cevap verir. Bunlar:

- 1- Nörotrofik faktörler
- 2- Nörit geliştirici faktörler
- 3- Matriks oluşturan faktörler
- 4- Metabolik ve diğer faktörler

Nörotrofik faktörler, denerve motor lif ve duyu reseptörlerinde bulunan makromoleküler proteinlerdir. Aynı zamanda rejenerasyon güzergâhındaki Schwann hücrelerinde de bulunurlar. Bu faktörler nörit gelişimi ve maturasyonunda yardımcı görevler üstlenir. En iyi bilinen nörotrofik faktör NGF (Nerve Growth Factor)'dir. Bunun yanı sıra siliyer nörotrofik faktör ve motor sinir gelişim faktörü de diğer önemli nörotrofik faktörlerdir. Normalde sinir hücrelerinde NGF ve NGF reseptörleri vardır. Yaralanma sonrasında NGF ve NGF reseptörleri ve bunların mRNA'ları distal parçada Schwann hücreleri ile birlikte artar. Bu artış makrofajlardan salınan büyük miktarda IL-1 ile sağlanır [34].

Nörotrofik faktörlerden farklı olarak nörit geliştirici faktörler, nörit gelişimini arttırıcı substrat bağlı glikoproteinlerdir. Bunlar içinde Laminin en iyi bilinen nörit geliştirici faktördür. Schwann hücresi bazal membranı, laminin gibi nöron geliştirici faktörleri içerir. Laminin içinde büyüme konisinde spesifik reseptörler mevcuttur. Laminin'in aksonal rejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Laminin'e karşı antikorların varlığında, nöritlerin periferik sinir iç erisinde ilerlemeleri engellenir. Bu moleküllerin de nörit gelişimini arttırdığı gösterilmiştir. Prekürsör (öncül madde) olarak matriks oluşturan fibrinojen, fibronektin ile polimerize olarak fibrin matriksini meydana getirir. Bu da hücre migrasyonu ve sinir rejenerasyonu için önemli bir substrattır [34].

Dördüncü grup, çok çeşitli faktörler içerir. Asidik ve bazik fibroblastik faktörler, insülin ve insülin benzeri gelişim faktörü, glia kökenli proteaz inhibitörü, elektrik stimülasyonu ve tiroid hormonu kortikotropin, östrojen, testosteron gibi hormonlar bu grupta değerlendirilirler [35].

2.2.2.4.Hasar Alanı

Aksotomiden sonra ve Waller dejenerasyonundan önce şiddetli ve hızlı bir şekilde travmatik dejenerasyon görülür. Bu sırada yoğun bir protein ve potasyum kaybı, sodyum ve kalsiyum artışı görülür. Medinaceli ve S eaber bu durumu kimyasal yanma olarak isimlendirmişlerdir [36].

2.2.2.5.Distal Akson Parçası

Aksotomiden sonra Waller dejenerasyonu denilen bir dizi olay gerçekleşir. Aksotomiden 48-96 saat sonra miyelin bozulmaya başlar. Bu sırada akson tanınmaz haldedir. Schwann hücresi, miyelin kılıfı fagosite etmek için proliferer olur. Bütün bu değişikliklere rağmen kesinin distalindeki akson parçasındaki harabiyetten yıllarca sonra rejeneratif aksonlar oluşturabildiği de görülmüştür [37]. Schwann hücresi çevre esindeki bazal lamina, laminin, tip IV kollojen, heparan sulfat, proteoglikan ve entakrin içerir. Schwann hücresi'nin bazal lamina içerisindeki davranışı, aksonun varlığını gerektirir. Aksotomiden sonra ilk gelişen olay, Schwann hücresi'nin miyelini fagosite etmesi için çoğalmasıdır. Sonuç olarak; rejenere olan akson, Schwann hücresi tarafından miyelin üretimine ihtiyaç duyar. Remiyelinizasyon derecesi, bazal lamina içerisinde rejenere olan aksonun tipine bağlıdır [37].

2.2.2.6.Kaslar

Aksotomiden sonra denerve olan kaslar atrofiye uğrar. Normal kaslarda motor son plak bölgesi asetilkoline cevap vermesine karşın denerve kaslarda bütün kas membranının asetilkoline cevap verdiği görülür. Rejenere olan motor lifler, kasa ulaşırlarsa selektif olarak eski son plak bölgesini reinerve ederler [37].

2.2.2.7.Sinir Tamiri

Sinir uçlarının cerrahi mikroskop altında bir araya getirilerek sütüre edilmesinden ibaret olan tamir işlemi iyi bilinen bir prosedür olup, epinöral ya da interfasiküler onarım şeklinde uygulanabilmektedir. Sütür hattı bölgesinde gelişen fibrozis ve skar oluşumunun olabildiğince azaltılması, fonksiyonel bir iyileşmenin elde edilebilmesi bakımından anastomoz için kullanılan sütür materyali ve uygulanan cerrahi teknik son derece önem taşımaktadır. Sütür işlemi için kullanılacak iğne olabildiğince ince ve atravmatik olmalı, sütüre edilecek sinirin kalınlığına göre 8/0 ya da 10/0 sütür materyalleri kullanılmalı, sütür sayısı çok fazla olmamalı ve epinöral onarımda sütürler epineuriumda sınırlı kalmalıdır [38]. Sinir uçlarının çok gevşek ya da çok sıkı bir şekilde birbirine yaklaştırılması sinir rejenerasyonunu olumsuz yönde etkileyecektir [39]. Yine, sütüre edilecek sinirin proksimal ve distal ucundaki fasiküler yapı dikkatle incelenmeli ve karşılıklı olarak doğru bir şekilde sütüre edilmelidir.

2.3.Pineal Bez

Pineal bez erişkin insanlarda ortalama ağırlığı 100-180 mg olup, 5-9 mm uzunluğunda, 3-6 mm genişliğinde, 3-5 mm derinliğindedir ve piamater ile sarılmıştır. Bezin küçük çapına karşılık kanlanması oldukça güçlüdür ve böbrekten sonra 2. en fazla kanlanan organdır [40, 41]. Venöz drenajı ise Galen

venine boşalan küçük venler aracılığıyla sağlanır. Kapiller yapısı ayrışık endotelial yapılanma gösterir ve kan-beyin bariyeri yoktur [41].

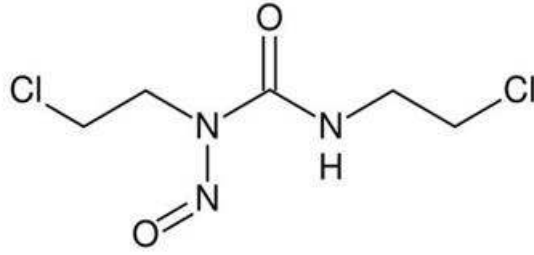
Pineal bez, görme sisteminin bir uç organı olarak ritmik ışık mesajının organizmadaki her organa iletilmesi işlevini görür. Işık uyarısı pineal beze karmaşık, çok nöronlu bir sistemle ulaşır. Retinadan başlayan nöral yolun birinci kısmı Retinohipotalamik traktusdur (RHT). Bu traktus, suprakiazmatik çekirdekte (SKÇ) sonlanır. Retinal ışık reseptörleri ışığı elektriksel uyarıya çevirerek monosinaptik olarak bu çekirdeğe iletir. SKÇ'ye ayrıca optik traktus aracılığı ile lateral genikulat cisimlerden de uyarı gelir. SKÇ'den çıkan lifler aynı zamanda hem pineale, hem de omuriliğin intermediolateral kolonuna gider ve buradan superior servikal gangliona (SSG) ulaşır. Sempatik bir ganglion olan SSG'den çıkan postganglionik lifler ise nervi conarii aracılığı ile yine pineal beze ulaşarak, kapillerler boyunca bez içinde dağılırlar [41, 42]. Pineal bez, sempatik innervasyondan başka az oranda parasempatik ve serotoninerjik sinir lifleri ile de innerve olur. Bu lifler bezin içinde, çoğunlukla pinealositlerin arasında serbest sinir uçları şeklinde sonlanırlar [41, 43].

Pineal bez, parenkimal ve interstisiyel hücreler olmak üzere iki hücre grubundan oluşur. Parenkim hücrelerine pinealosit adı verilir. Pinealositlerin pineal bez içerisindeki oranı %90'a ulaşır ve bu hücreler aşağı omurgalılarda fonksiyonel ışık reseptörleridir. Retinanın kon hücrelerine benzerlik gösterirler ve ışık enerjisini elektriksel sinir uyarısına dönüştürürler. Filogenetik gelişim sürecinde, memeli pinealosit hücresi ışık uyarısına direkt yanıt veren hücre özelliğini kaybeder ve salgı fonksiyonu ile çeşitli hedef bölgelerde karmaşık ve çok nöronlu düzenleyici bir ara istasyon işlevi kazanır. Birçok memeli türünde tek tip pinealosit hücresi tanımlanmış olmasına karşın, insan dahil bir grup memelide tip 1 ve 2 olarak iki tip pinealosit hücresi bulunduğu gösterilmiştir [44, 45]. Pinealositlerden başka pineal bez içinde bulunan en önemli hücre topluluğu glial hücrelerdir. Bunların bez içindeki oranı %5-10 arasında değişmektedir. Ayrıca mast hücreleri, plazma hücreleri, pigment içeren hücreler, çizgili kas dokusu ve sinir hücreleri de pineal bez içerisinde bulunurlar. Pineal bezin sapında ise seyrek olarak pinealositler, glial hücreler ve myelinsiz sinir lifleri bulunur [46, 47].

Pineal bezin salgı fonksiyonu 2 ana grup endojen madde ile sağlanmaktadır. Bunlar indolaminler ve peptidlerdir. Indolaminler içinde en önemlisi 232 moleküler ağırlıklı N-asetil-5-metoksitriptamin (Melatonin)'dir [46].

2.4.Melatonin

Kimyasal olarak N-asetil-5-metoksitriptamin olarak bilinen melatonin (Şekil 2. 7) ilk olarak 1958 yılında Lerner ve arkadaşları tarafından sıgır pineal bezinde izole edilmiştir. Bu indolamin başta memeliler olmak üzere diğer canlılarda da doğal olarak bulunmaktadır [48].



Şekil 2.7.Melatoninin kimyasal yapısı [49].

2.4.1.Melatoninin Sentez ve Metabolizması

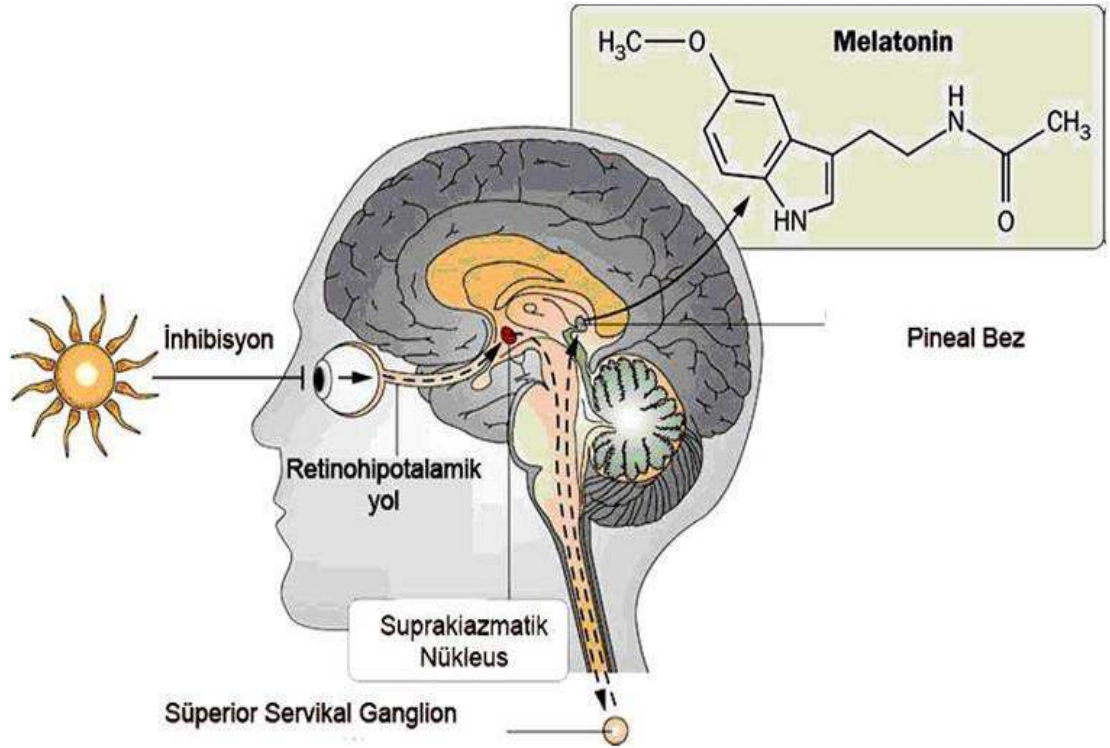
Melatoninin, öncü aminoasiti triptofandır. Triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana, 5-hidroksitriptofan'da aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) aracılığıyla 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin)'e dönüştürülür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile N-asetilserotonine (NAS) ve son olarak N-asetilserotonin hi droksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine (5-metoksi-N-asetiltriptamin) dönüştürülür. Melatonin, esas olarak pineal bezdeki pinealositlerde sentez edilmektedir. Aynı zamanda gastrointestinal sistem, lens, retina ve diğer pek çok organda sentez edildiği gösterilmiştir [50, 51].

Melatonin sentezlendikten sonra depolanmaz. Düşük molekül ağırlık, lipofilik ve hidrofobik özelliklerinden dolayı pasif diffüzyonla dışarı atılır. Kan'da bulunan melatonin %70 oranında plazma albuminine bağlıdır. Dolaşımdaki melatonin beyin omurilik sıvısı da dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara dağılır. Melatonin anneden fetusa plasental yol, yenidoğanda süt ile geçmektedir. Melatoninin kandaki yarılanma süresi 10-40 dakikadır. Esas olarak karaciğerde metabolize olmaktadır. Karaciğerden ilk geçişte %90'ı mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonine dönüşür. İdrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksi-melatonindir [52].

2.4.2.Melatonin Sentezinin Düzenlenmesi

Melatonin sentezinde rol alan başlıca faktör, aydınlık-karanlık döngüsüdür. Pineal bez, görme sisteminin bir uç organı olarak ritmik ışık mesajının canlıdaki her organa iletilmesini sağlamaktadır. Retinadan başlayan bu yolağa "Retinohipotalamik yol" adı verilmektedir. Retinal ışık reseptörleri ışığı elektriksel uyarıya çevirerek suprakiazmatik çekirdeğe iletir. Suprakiazmatik çekirdekten çıkan lifler pineal bez ve omuriliğin intermediolateral kolonuna gider ve buradan süperior servikal gangliona (SSG) ulaşır. Sempatik bir ganglion olan SSG'dan çıkan postganglionik lifler aracılığıyla pineal beze ulaşarak kapiller boyunca bez içinde dağılırlar [53]. Endojen melatonin sekresyonu ritmi, retinohipotalamik yol aracılığıyla çevresel ışık-karanlık ile düzenlenmektedir (Şekil 2. 8). Suprakiazmatik çekirdeğin elektriksel aktivitesi, günlük periyodun karanlık döneminde baskılanır bu baskılanma sonucunda, pineal bez sempatik sinirleri aktive olur. Pineal bezi innervasyonundan postganglionik sempatik sinir fibrillerinden nöradrenalin salgınır ve 3-5 siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve adenil siklaz aktivite olur. Ayrıca pinealositlerde B adrenerjik ve alfa-1 reseptör aktivasyonu gösterilmiştir. Alfa-1 reseptörler, protein kinaz C (PKC) ve kalsiyum

miktarındaki artış ile aktive olur. Alfa-1 reseptör ve c AMP aktivasyonu ile melatonin sentezi başlar [53].



Şekil 2.8.Melatonin sentezinin düzenlenmesi [54].

2.4.3.Melatoninin Görevleri

Melatoninin sirkadiyen ritim düzenlenmesi, reproduktif fonksiyonlar, kanser, immün sistem gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir [55].

2.4.3.1.Sirkadiyen Ritim Düzenlenmesi

Bitkilerin, hayvanların, mantarların ve siyanobakterilerin 24 saatlik süreç içerisindeki biyokimyasal ve psikolojik davranışlarını düzenleyen sirkadiyen ritimde melatoninin etkili olduğu bulunmuştur [55].

2.4.3.2.Antioksidan Özellikleri

Serbest oksijen radikalleri; kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejenaratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol alırlar. Melatonin, nitrit oksit, singlet oksijen, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hipoklorik asit (HOCl), süperoksit radikali, ($O_2^{\cdot-}$) ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ve ya peroksinitröz asit'in ($OHOOH$) toksik reaktif oksijen ara ürünü olan serbest oksijen radikallerinin temizlenmesine yardımcı olmaktadır. Peroksit radikalleri poliansatüre asitlerin oksidasyonu sırasında oluşmaktadır ve melatonin bir antioksidan olan vitamin E'den 2 kat daha güçlü bir şekilde bu radikalleri temizleyebilmektedir. Melatonin deriveleri 3 -hidroksimelatonin N 1-asetil-N2-formil-5-methoksikiynuramin (AFMK) ve N -asetil-5-methoksikiynuramin (AMK), melatonin kadar güçlü serbest radikal temizleyici özelliğindedir [56]. Melatonin aynı zamanda mitokondri, nükleus DNA'sı, sitoplazmadaki proteinler

ve hücre membranında bulunan lipidleri serbest oksijen radikallerinin toksik etkisinden korumaktadır. Yapılan çalışmalarda, serbest oksijen radikalleri süpürücü etki ile hastalıkların şiddetinin azalmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Melatoninin katalaz, süperoksit dismutaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidatif enzimleri uyardığı rapor edilmiştir [57].

2.4.3.3.Endokrin Etkileri

Melatonin, büyüme hormonu, gonadotropinler, prolaktin, testesteron, progesteron, östrojen gibi steroidlerin sentez ve fonksiyonlarını etkilemektedir. Özellikle büyüme hormonu, prolaktin ve melatonin arasında faz-bağımlı ilişki olduğu gösterilmiştir. Pubertede ve puberte öncesinde gonadotropik hormonların düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Erken puberteli çocuklarda düşük, gecikmiş puberteli çocuklarda yüksek melatonin düzeyleri gözlenmiştir. Menapozun pineal kalsifikasyondaki artış ve plazma melatonin düzeyindeki düşüş ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Hayvanlarda melatoninin paratiroid hormonunun salınımının baskılanması ve paratiroid bezlerinin uyarılması ile fosfor ve kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde rol aldığı rapor edilmiştir [58].

2.4.3.4.İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Pinealektomi yapılan farelerde, lenfoid dokuda atrofi ve antikor üretiminde azalma olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar, melatoninin bazı sitokinlerin salınım ve sentezini arttırdığını desteklemektedir. Melatonin lenfositlerden IL-1, IL-2, IL-6, (İnterlökin), INF- γ (İnterferon gamma) salınımını arttırarak onların sitotoksik aktivitelerini arttırmakta ve antijeni tanımlarını kolaylaştırmaktadır [59, 60]. Lenfositlerin maturasyonunu uarmakta ve NK (Natural Killer, doğal öldürücü) hücrelerini aktive etmektedir [61]. Kemik iliğinde melatonin sentezinin gösterilmesi immün sistem ile melatonin arasındaki ilişkiyi desteklemektedir [62].

2.4.3.5.Onkostatik Etkileri

Melatoninin, pek çok kanser semptomlarının şiddetini hafifletici, tümör anjiogenezi, proliferasyonu ve metastazını baskılayıcı etkileri olduğu gözlenmiştir. Melatonin bu etkilerini;

- Kanser hücreleri tarafından yağ asit büyüme faktörü alımını baskılama,
- Telomeraz uzunluğunun azaltılması ve telomeraz aktivitesinin azalmasına yol açarak kanser hücrelerinin apoptozunu uyarma,
- Tümörlerdeki damar büyümesini başlatan anjiyogenik faktör olan endotelin-1 sentezini baskılama,
- TP53 tümör süpresör geninin transkripsiyonunun düzenlenmesi, gibi birçok mekanizma aracılığı ile gerçekleştirmektedir [55].

Epidemiyolojik çalışmalar, gece ışığa maruz kalmanın meme kanseri için potansiyel risk faktörü olduğunu desteklemektedir. İn vitro ortamda melatonin ile tedavi edilen kanser hücrelerinde büyümenin yaklaşık %80 oranında baskılandığı gözlenmiştir. Melatoninin, MCF-7 (insan meme ade nokarsinom hücre serisi) hücrelerindeki onkostatik etkilerinde antiöstrojenik etkisinin rol aldığı gösterilmiştir [61].

2.4.3.6.Termoregülatör Etkileri

İnsan vücut sıcaklığının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kahverengi adipoz dokuyu stimüle etmektedir [52].

2.4.3.7.Hücre Koruyucu Etkileri

Melatonin, ultraviyole radyasyonunun neden olduğu genetik hasardan deri ve diğer hücreleri korumaktadır. İyonize maruziyetten önce melatonin uygulananlarda, kardeş kromatid değişimi, kromozomal bozukluk ve genetik hasarın % 60 oranında azaldığı gözlenmiştir [63].

2.4.4.Melatoninin Klinikte Kullanımı

Melatonin kanserde kemoteropötik ajanlarla beraber kullanıldığında tümör gerilemesine ve hastalığın stabilizasyonuna yardımcı olmaktadır. Klinik denemelerde melatoninin kalp hastalıklarını önleyici ve yaşlanmayı geciktirici etkileri olduğu gözlenmiştir. 2006 yılında Buscemi ve ark. melatoninin sekonder uyku bozukluklarının tedavisinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir [55].

2.4.5.Melatoninin Vücuttaki Etki Mekanizmaları

Melatonin memelilerdeki etkilerini üç mekanizma ile gerçekleştirmektedir;

1. Kalmulin gibi intraselüler proteinlere bağlanarak
2. Antioksidatif etkilerle
3. Plazma membranında bulunan melatonin reseptörlerine bağlanarak

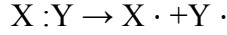
Melatonin, kalmoduline kalsiyum bağlanmasını antagonize etmektedir. Bunun meme kanser hücrelerindeki antiproliferatif etki mekanizmalarından birisi olduğu düşünülmektedir. Melatoninin immünmodülatör ve sirkadiyen ritm üzerindeki etkilerinin bir kısmını, bu mekanizma aracılığı ile gösterdiği düşünülmektedir. Melatonine ait iki tip membran reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar, melatonin reseptör tip-1 (MT1) ve melatonin reseptör tip-2 (MT2) olarak adlandırılmaktadır. İnsanda, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, reproduktif sistem, deri, üriner sistem gibi pek çok yerde bu reseptörlerin varlığı gösterilmiştir. İnsan vücudunda, SCN ve adenohipofiz pars tüberalis melatonin reseptörlerinin en yoğun bulunduğu yerlerdir. İnsanlarda ve sıçanlarda hippocampüste MT1 ve MT2 reseptörünün varlığı gösterilmiştir. İnsan serebellar korteksinde, MT1 ve MT2 reseptörlerinin her iki kısmının da bulunduğu gösterilmiştir. MT1 reseptörleri basket-yıldız hücreleri ve granüler hücrelerde bulunmaktadır [64].

2.5.Serbest Radikaller

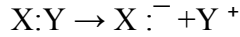
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir. Yarı ömürleri çok kısadır. Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler [65].

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler [66].

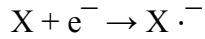
1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan bağ kırılması.



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybolması. Kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ve ya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. İki serbest radikalın birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturmasını sağlar [67].

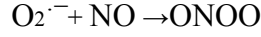
2.5.1.Serbest Radikal Oluşumu ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikali. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen (O_2), iki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğu için kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif bir özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1-2 oranında moleküler oksijen kaçığı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar [67].

2.5.1.1.Süperoksit Radikali

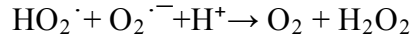
Tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest süperoksit radikali anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir [68]. Diğer radikallere oranla reaktivitesi çok azdır. Oluşumuna neden olduğu radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması

bakımından önemlidir [67]. Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.

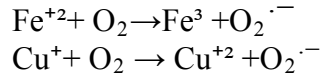


Böylece NO'un normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO₂), hidroksil radikali (·OH) ve nitronyum iyonu gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler. Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali (HO₂·) oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'daki protonlanmış formu % 1 'den azdır. Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükta olarak görev yaptığında, örneğin ferrisitokrom c'nin ya da nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'yi indirgemesi SOD tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen O₂·⁻ tayini yapılır [69].

Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir. Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksid meydana gelir.



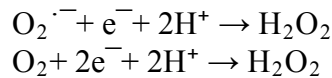
İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.



Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler. Bu yüzden, geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları, geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir. Süperoksit radikali, sülfidril gruplarının disülfidlere yükseltgenmesine ve ferritin demir formuna indirgenerek, ferritinden demirin direkt olarak ayrılmasına neden olur. Ferritin, demirin güvenli depolama formudur. Demir, süperoksit radikali ve H₂O₂'den OH üretimini teşvik eder [70].

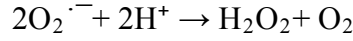
2.5.1.2.Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂, membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır [71].

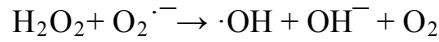


Hidrojen peroksit, genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak

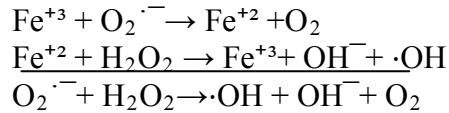
hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Bu dismutasyon, ya spontandır ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4 - 8'de en hızlıdır. Bu pH'da protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat hem protonlanmış radikalın arttığı daha asit pH'da, hem de süperoksit iyonunun fazla olduğu alkali pH'da bu hız belirgin şekilde düşüktür. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir [66, 72]. Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içinde girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona, Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise çok hızlıdır ve Fenton reaksiyonu adını alır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra, bu ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot OH$ ve OH^- üretilir.



Mitokondride bol miktarda H_2O_2 bulunur. Metal iyonları da çok olduğu için çok fazla hidroksil radikali üretimi söz konusudur. Bu metal katyonları, DNA veya hücre zarına bağlanırsa hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir [73].

2.5.1.3. Hidroksil Radikali

Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik olanı hidroksil radikalidir ($\cdot OH$). Hidrojen peroksidin geçiş metallere indirgenmesiyle, hidroksil radikali ($\cdot OH$) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları hidroksil oluşumundaki en önemli reaksiyonlardır [74]. Hidroksil radikali oluşunca hemen üretildiği yerin birkaç $\text{\AA}$ uzaklığında herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Reaktifliği yüksek olduğu için 37°C 'de beklenen yarılanma ömrü 1×10^{-9} saniyedir [75]. Nükleer ve mitokondriyal DNA, membran lipidleri ve karbonhidratları gibi, hücrenin makromolekülleri üzerine yıkıcı etki yapmamaktadır [76, 77].

2.5.1.4.Singlet Oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikal tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır [78]. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak, kendi yörüngesinin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur. Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijenin paylaşılmamış dış elektronları, yörüngelerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki formda singlet oksijen adı verilmektedir. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışıkkıyır [66].

2.5.1.5.Nitrik Oksit

Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$), tek sayıda elektron içeren renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir. Bakteriler, sigara dumanı ve egzoz gazları reaktif azot oksitleri üretir. $\text{NO}^\cdot$ kararlı bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında birçok fonksiyonda rol oynar [79]. Hücre içi konsantrasyonu fazla arttığında nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktivitelerinde zayıflamaya neden olur. Nitrik oksitin elektron tranport zincirindeki demir içeren komplekslere saldırması, bozulmuş enerji metabolizmasıyla sonuçlanır. Nitrik oksit oluşumunun artması sinir hücreleri tahribatına yol açar [73].

2.5.2.Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri esnasında ve organizmanın çeşitli dış etkilere maruz kalmasıyla meydana gelir. Serbest radikaller, iyonize radyasyon, stres yapıcı durumlar, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda vücuttaki biyolojik fonksiyonların yan ürünü olarak oluşurlar [80].

a- Biyolojik kaynaklar

- i. Aktive olmuş fagositler
- ii. Antineoplastik ajanlar: nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicine
- iii. Radyasyon
- iv. Alışkanlık yapan maddeler: alkol ve uyuşturucu maddeler
- v. Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- vi. Stres: Stresten kortikosteroidlerin düzeyi artar. Kortikosteroidlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.

b- İntrasellüler kaynaklar

- i. Küçük moleküllerin otooksidasyonu
- ii. Enzimler ve proteinler, ksantin, oksidaz, triptofan, dioksijenaz, hemoglobin

- iii. Mitokondrial elektron transportu
- iv. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b5)
- v. Peroksizomlar: oksidazlar, flavoproteinler
- vi. Plazma membranı: lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu
- vii. Oksidatif stres yapıcı durumlar: iskemi, travma, intoksikasyon

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda artırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler;

- i. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit gazı örnek olarak verilebilir. Bu radikal iyi bir lipid peroksidasyon başlatıcısıdır.
- ii. Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikaline dönüşür. Bu radikalin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.
- iii. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. Bunun tipik bir örneği paraquat'tır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur.
- iv. Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki önemleri lipid peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri, lipid peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece zararlı olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler [81].

2.5.3.Serbest Radikallerin Etkileri

Reaktif serbest radikaller, lipidler, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi hücresel bileşenlere zarar verirler. Serbest radikaller çok kısa ömürlü oldukları için oksidatif hasar, serbest radikal ara basamakları içeren zincir reaksiyonları tarafından gerçekleşir. Bir serbest radikal, radikal olmayan başka bir molekül ile reaksiyona girerek yeni bir serbest radikal oluşturular. Oluşan yeni

serbest radikal de başka moleküllerle reaksiyona girerler. Lipid peroksidasyonu, başlangıç serbest radikaller ile değil sekonder serbest radikaller üzerinden dokulara hasar verir [82].

2.5.3.1.Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller bi yomoleküllerin çoğunu etkiler, ancak lipidler en hassas olanlarıdır [83]. Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman, organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bi linir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sonuçlanır. Bu ürünlerden başlıcaları olan hidroksinonenal (HNE) ve MDA, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluşturur. Lipid peroksitlerinin hücre yaşamı için en önemli etkileri, membran yapısında ve hücre bölünmesinde meydana getirdikleri değişimlerdir [81, 84].

2.5.3.2.Proteinlere Etkileri

Proteinlerin, serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklindedir. Proteinlerde parçalanma ve çapraz bağlanmalar meydana gelir. Protein fonksiyonlarında (kataliz, transport, reseptör gibi) bozulmalar ve immün sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler oluşabilir [79]. Serbest radikal hasarı proteinler üzerinde birikmişse veya proteinlerin belirli bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar [66, 84].

2.5.3.3.Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

DNA yapısında oksidatif hasara sebep olan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna neden olarak direkt hasara yol açarlar. Bazı serbest radikaller de DNA'ta mirasimlerini etkileyerek hasara yol açarlar. İyonize radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede değişime ve ölüme yol açarlar. DNA yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve yıkım, sonuçta DNA'nın denatürasyonuna neden olur. Oksidatif hasar da l kırıkları, baz çifti değişimleri, yeniden düzenlenme gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır. DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir [76, 85].

2.6.Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba

ayrılırlar. Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler. Antioksidanlar, hücrenin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler [66, 86].

A- Doğal (Endojen) Antioksidanlar;

Enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar şeklinde ikiye ayrılırlar.

a-Enzimler

- i. Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- ii. Süperoksit dismutaz (SOD)
- iii. Katalaz (CAT)
- iv. Glutasyon Peroksidaz (GPx)
- v. Glutasyon-S-transferaz
- vi. Hidroperoksidaz

b- Enzim olmayanlar

- i. Lipid fazda bulunanlar; α -tokoferol (E-vitamini), β -karoten
- ii. Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya plazmada bulunanlar); askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon

B- Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)

- i. Ksantin oksidaz inhibitörleri
- ii. NADPH Oksidaz inhibitörleri
- iii. Rekombinant süperoksit dismutaz
- iv. Trolox-C

2.6.1.Enzimatik Antioksidanlar

2.6.1.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler [87, 88].



Bu reaksiyon kendiliğinden de meydana gelebilir. Fakat SOD ile katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar. İnsanda, SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitoplazmada bulunan Cu ve Zn içeren SOD ve mitokondride bulunan Mn içeren SOD'dır. Süperoksit, oksijeni metabolize eden hücreleri serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korur. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Normal metabolizma sırasında, hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur [89, 90].

2.6.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GPx'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlar gibi GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GPx oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar [81, 91, 92].

2.6.1.3. Katalaz

Katalaz, aerobik hücrelerin çoğunda bulunur. Görevi, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır [93]. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim, bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit, metil, etil ve hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez [81].



2.6.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.6.2.1. C Vitamini

C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilen vitaminlerden olan C vitamini, özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Isıtmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır [81]. C vitamini, organizmada çeşitli hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgen olarak rol oynar. Safra asitlerinin sentezinde ve demirin emiliminde önemli fonksiyonları vardır. C vitamini yara iyileşmelerinde oldukça etkilidir [94].

C vitamini, süperoksit ve hidroksil radikalleriyle kolayca reaksiyona girerek onları ortadan kaldırır. C vitamininin, bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir. C vitaminin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında oksidan etki de göstermesidir. C vitamini, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücresel ajandır. C vitamini süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü ve ya pro-oksidan olarak değerlendirilir. Oksidatif patlama sırasında, reaktif moleküller çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, koruyucu enzimlerin inaktivasyonuna sebep olurlar. C vitamini, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller [95].

2.6.2.2. E Vitamini

E vitamini tokoferol yapısında olup ilk olarak 1922 yılında izole edilmiştir. Alfa, beta, gama ve delta olarak adlandırılan dört tokoferol karışımıdır. α -tokoferol, doğal dağılımı en geniş ve biyoaktivitesi en fazla olanıdır [95]. α -tokoferol, dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Miyokard membranındaki miktarı da fazladır. Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır. E vitamini en çok yer fıstığı,

badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytinyağında eser miktarda bulunur [96]. Diyetle yağda çözünmüş olarak alınır, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir. E vitaminin en önemli depolanma yeri yağ dokusudur [96]. GPx ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. GPx, teşekkül etmiş peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller. [95]. E vitamini, lipid peroksit radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığından zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir.

2.6.3.Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

- i. Toplayıcı etki
- ii. Bastırıcı etki
- iii. Onarıcı etki
- iv. Zincir kırıcı etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek, onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler. Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitaminler bu tarz bir etkiye sahiptirler. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir [94].

2.7.Somatosensoriyel Korteks ve Somatosensoriyel Uyarılma Potansiyelleri

2.7.1.Somatosensoriyel Korteks

Duyusal bilgiler, Medulla spinalis (omurilik)'e periferik sinirlerin afferent lifleri ile taşınırlar. Bu afferent lifler arka kök ganglionlarında bulunan primer duyusal nöronların periferik uzantılarıdır. Duyusal nöronların santral uzantıları ise Medulla spinalis'e arka köklerden girer ve duyusal bilgiyi ikinci duyusal merkezlere taşırlar [97]. Somatik duyusal sinyaller Medulla spinalis'e 2 ana yol ile taşınır:

a) Funiculus Posterior – Lemniscus Medialis sistemi:

Dokunma ve derin duyumları (proprioseptif) taşıyan sistemdir. Bu yol, arka kök ganglionlarının santral uzantılarından (primer afferent lifler) ve kısmen de arka boynuz III. ve IV. laminalarındaki nöronların aksonlarından oluşmaktadır. Bu aksonlar kaudal medulla kauda spinalis yapmadan devam eder. Üst spinal düzeylerden itibaren 2 ayrı fasikül şeklinde yükselir. Medialden laterale doğru sakral, lumbal ve üst torasik segmentlerden gelen lifler fasikülüs gracilis, üst torasik ve servikal segmentlerden gelen lifler ise fasikülüs cuneatus içinde yol alırlar. Bu fasiküller kaudal medulla düzeyinde sırasıyla nukleus gracilis ve nukleus cuneatus adı verilen arka kordon nukleuslarında bulunan ikinci duyusal nöronlarla sinaps yaparlar. Bu nöronların aksonları ise medulla düzeyinde çaprazlaşarak medial lemniskusu oluştururlar. Medial lemniskus, beyin sapından ilerleyerek talamusta sonlanır. Talamus, koku duyası hariç, tüm istemlerden gelen afferent impulsları amaca yönelik filtre eder [98]. Gelen duyusal yollar lateral talamustaki spesifik ara nöronlardan geçerek ventral posterior nukleus

aracılığıyla serebral kortekse iletilir. Gövde ve ekstremitelerden gelen bilgiler ventral posterolateral nükleusta, yüz bölgesinden gelen bilgiler ise ventral posteromedial nükleusta sinaps yaparlar. Ventral posterior nükleus ganglionundaki üçüncül duyuşal nöronların aksonları ise internal kapsülün arka bacağından geçerek primer somatosensoriyel kortekse ulaşır [98].

b) Anterolateral Sistem:

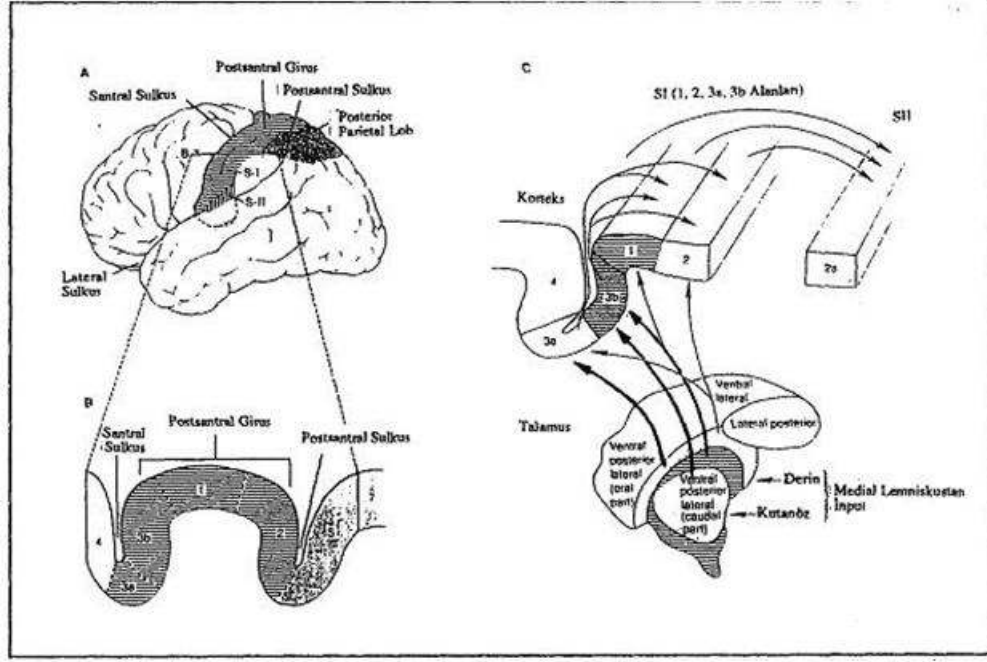
Somatik duyumların iletiminden sorumlu ikinci ana duyuşal sistemdir. Ağrı, ısı ve basit dokunma duyumlarının merkezlere taşınmasında işlev görmektedir. Bu sistem, 3 ayrı çıkan yoldan oluşmaktadır: spinotalamik, spinoretiküler ve spinomezensefalik traktuslar.

Bu sistemin – Lemniscus Medialis sisteminden farklıdır [98].

- 1) Bu sisteme ait primer afferent lifler, ilk sinapslarını medulla spinalisin arka boynuzu düzeyinde yaparlar. Dolayısıyla spinal arka boynuzda bulunan ikincil duyuşal nöronların aksonlarından oluşmaktadır.
- 2) Anterolateral sistem M. spinalis'e segmental düzeyde çaprazlaşır. Bu nedenle Funiculus Posterior sisteminin aksine M. spinalis'de kontrolateralde yükselir.
- 3) Anterolateral sistemdeki lifler talamusun yanı sıra beyin sapı, hipotalamus gibi bölgelerde de sonlanırlar. Dolayısıyla daha yaygın bir dağılım gösterirler [97, 98].

Anterolateral sistem lifleri talamusta dorsal ve ventral posterolateral nükleus, intralaminar ve posterior nükleuslar olmak üzere 3 bölgede sonlanır. Ventral posterolateral nükleustan çıkan lifler, sadece somatik duyuşal korteks alanlarına, posterior nükleuslardan çıkan lifler ise somatosensoriyel korteks alanları dışında kalan parietal bölgelere de ulaşır; oysa intralaminar nükleuslar daha yaygın olarak korteks ve bazal ganglionlarla bağlantı gösterirler [97, 98].

Duyum ve algılamanın gerçekleşebilmesi için impulsların serebral korteks düzeyine iletilmesi zorunludur. Duyum ile ilgili en önemli kortikal bölge, primer somatosensoriyel korteks (S-I) olarak isimlendirilmektedir. Bu bölge, postsantral girus ve santral sulkusun derinliklerinde lokalizedir. Bu korteks bölümü, her biri somatik duyumla ilgili farklı roller üstlenmiş 4 fonksiyonel alandan oluşmaktadır. Bu alanlar Brodmann'ın, 1, 2, 3a ve 3b olarak belirlediği korteks bölümleridir [99]. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Somatosensoriyel korteks [99].

Sekonder somatosensoriyel korteks (S-II) ise lateral sulkusun (Sylvian sulkus) üst duvarında insulaya bitişik yerleşimlidir. Bu korteks alanına, duyu bilgileri esas olarak primer somatosensoriyel korteksten gelmektedir. Primer ve sekonder somatosensoriyel korteksler dışındaki posterior parietal lob alanlarına da bir kısım duyu bilgilerin ulaştığı bilinmektedir [97].

Somatosensoriyel korteks 2 majör nöron grubundan oluşmaktadır:

1) Piramidal hücreler, korteksin çıkış (output) nöronları olup, lokalizasyonlarına ve çıkış bölgelerine göre birçok alt grupta incelenirler. Korteksin 2. ve 3. tabakalarındaki piramidal hücreler değişik kortikal alanlara ulaşırlar. Oysa 5. ve 6. tabakalardaki piramidal nöronlar diğer subkortikal alanlara ve geriye talamusa bağlanırlar.

2) Nonpiramidal hücre grubu ise, değişik tiplerde nöronlardan oluşurlar ve çoğunluğu yaygın dallanmalar gösterirler. Bu hücrelerin de çoğu piramidal hücreler gibi asıl girişlerini (input) talamik afferentlerden alırlar [99]. Somatosensoriyel korteks alanlarında fonksiyonel olarak somatotopik bir yerleşim gözlenir. Dolayısıyla vücudun farklı bölgelerine ait kısımlardan gelen bilgiler, somatosensoriyel korteksde farklı bölgelere ulaşır.

Primer somatosensoriyel korteks, tüm duyu modalitelerinin işlenmesinde önemli rol oynar. Talamusun ve ventral posterior nükleer kompleksinin lateral ve medial kısımlarındaki nöronlar, primer somatosensoriyel korteksin değişik bölümlerine bağlanırlar. Bu alanlar, kortekste piramidal hücrelerde sonlanırlar ve onları kuvvetle eksite ederler. Aynı zamanda nonpiramidal internöronlarla da sinaps yaptıkları bilinmektedir. Primer somatosensoriyel korteks içinde 1, 2, 3a ve 3b alanları arasında ve bu alanlarla posterior parietal korteks arasında bağlantılar bulunur. Bu bağlantılar S-I ve S-II

arasında ve bu iki korteks alanı ile motor korteks arasındaki karşılıklı bağlantılardır. Aynı zamanda her 2 hemisferin simetrik duyuşal alanları arasında korpus kallozum aracılığıyla kurulan bağlantılar da mevcuttur [99].

Primer somatosensoriyel korteks, 4 majör subkortikal bölgeyle ilişkilidir. Bunlar bazal ganglionlar ve talamus (ventral posterior nükleer kompleks), Funiculus Posterior nükleusları ve M. spinalis arka boynuzudur [98].

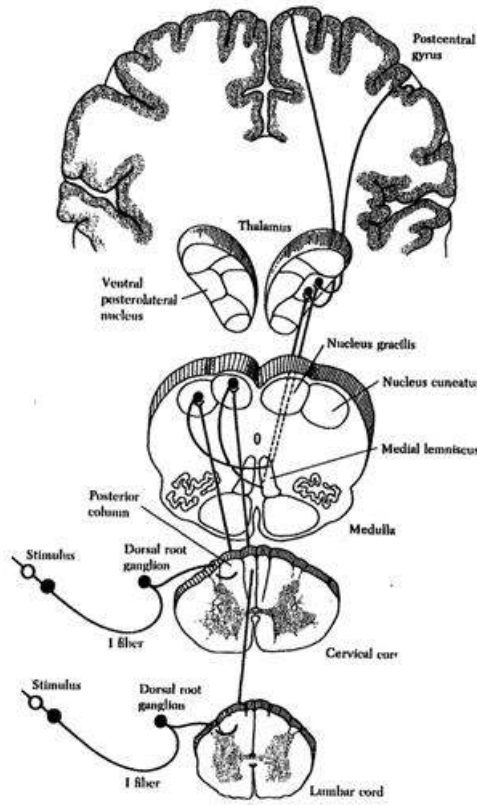
Talamik duyuşal afferentlerin çoğu 3a ve 3b alanlarında sonlanırlar. Bu alanlardaki hücreler daha sonra Brodmann'ın 1 ve 2. alanlarına ulaşırlar (Şekil 2. 9). Talamik nöronların aynı zamanda 1 ve 2. alanlar ile sekonder somatosensoriyel korteksle de doğrudan bağlantıları bulunur. Bununla beraber talamik nöronlar, posterior parietal korteks, motor korteks ve S-I ile de bağlantılıdır. Primer somatosensoriyel korteksin 1, 2, 3a ve 3b alanlarında ve S-II'de ayrı ayrı vücut yüzeyinin representasyonu saptanmıştır [100].

Somatosensoriyel korteksin fonksiyonel yapılanmasındaki önemli bir özellik ise bu korteksin 4 alanına da (3a, 3b, 1 ve 2) tüm vücut yüzeyinden projeksiyonların gelmesidir. Fakat Merzenich ve Kaas [101], çalışmalarında her bir alanda bir modalitenin baskın olduğunu göstermiştir. Bunlardan 3a alanında kas içiciklerinden, 3b alanında tüm kutanöz reseptörlerden, 2 nolu alanda derin basınç reseptörlerinden, 1 nolu alanda ise hızla adapte olan kutanöz reseptörlerden gelen bilgilerin baskın olduğu saptanmıştır. Kısacası 3b ve 1 nolu alanlara primer olarak taktir inputlar, 3a alanına primer olarak grup 1 kas (gerilim) afferentleri, 2 nolu alana ise primer olarak eklem reseptörlerinden informasyonlar ulaşmakta ve işlenmektedir [102].

2.7.2.Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller (SEP)

Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller, periferik ya da kranial sinirlerin elektriksel, fizyolojik (dokunma, eklem hareketleri, vibrasyon, kas kasılması gibi) ya da mekanik yöntemlerle uyarımının, duyuşal sistemde periferik sinirden başlayıp, somatosensoriyel kortekse kardaki yollar ve merkezler boyunca oluşturduğu elektriksel değişikliklerin tümüdür [102].

Uyarılan bir sinirde oluşan duyu potansiyellerinin serebral kortekse ulaşabilmeleri için periferik sinirleri, medulla spinalisi, beyin sapını ve talamokortikal lifleri geçmeleri gerekmektedir. SEP'ler büyük oranda santral sinir sisteminde dorsal kolon, medial lemniskal sistem ile periferik sinirlerde geniş çaplı Ia duyuşal lifleri ile oluşturulurlar [103] (Şekil 2. 10).



Şekil 2.10.SEP'lerin yolları [103].

SEP'leri bugünkü anlamda ilk olarak 1947 yılında Dawson adlı bir bilim adamı incelemiştir [104]. İlk klinik uygulamalar ise Halliday ve arkadaşlarına aittir [105].

Uyaran kol, bacak, yüz veya vücudun diğer bir alanındaki motor veya duysal sinirlere ardışık elektrik uyarısı olarak verilir ve uyarı verilen bölgede hafif hareket etmesine neden olan uyaran şiddeti yeterli kabul edilir. Uyarılan sinirin vücuttaki gidiş yolu üzerinden ve uyarının sonlandığı beyin bölgesine uyan kafatası derisinden belli yanıtlar kaydedilir. Tekrarlanan uyarılarla el de edi len yanıtların ortalaması alınır. Çeşitli işaretlemeler yapılarak yanıtların zamana göre dağılımı, genlikleri ve şekilleri kontrol edilir. Uyarılan sinir yolu üzerinde herhangi bir sorun varsa beklenen yanıt geçikebilir, genliği düşebilir, şekli bozulabilir ve hatta tamamen kaybolabilir [106].

Somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller yaş, boy, vücut ve e kstremitte sıcaklığı gibi fizyolojik faktörlerden olumsuz etkilenirler. Aynı zamanda yaşlanma ile birlikte de latens uzamaları gözlenebilir. SEP'lerin mutlak latenslerini belirleyen en önemli faktörlerden biri olan duysal sinyalin katettiği yol, deneğin boyu ile doğru orantılıdır [107].

Somatosensoriyel uyarılmış potansiyellerin kaydı alındıktan sonra, önce kortikal ve subkortikal bileşenlerin tepe latensleri ölçülür. Latens, uyarım sinyali ile birlikte ortaya çıkan bileşenlerin negatif ya da pozitif tepe noktalarına kadar

ölçülen zaman birimidir ve ms olarak ifade edilir. Bu değer mutlak anlamda latensi verir. Ancak mutlak latensler ekstremit ve tüm boy uzunluğuna göre bireyler arası değişkenlik gösterir. Bu nedenle mutlak latenslerin yerine “santral iletim zamanı” dediğimiz değerler ölçülür. Böylesine ölçüm yaklaşımı ile bir yandan bireyler arası boy farklarının yarattığı latens değişkenliği azaltılmış olur, bir yandan da periferik sinir sistemindeki özellikler ve patolojiler kısmen devre dışı bırakılmış olur. Somatosensoriyel uyarılmış potansiyellerin incelemesinde bir anomaliyi en belirgin şekilde gösteren bulgu, potansiyellerin kaybolması veya latenslerinin uzamasıdır. Genliklerin yanında, potansiyellerin morfolojik özellikleri de değerlendirilir. Ancak genlik değerlendirmesi genellikle güç olur. Çünkü aynı bireyde bile değişik zamanlarda çok değişik genlik değerleri elde edilebilir [108].

DeneySEL SEP çalışmalarında P_1 , N_1 , P_2 , N_2 olarak adlandırılan değişik dalga formları içermekte ve SEP değerlendirmesinde, bu dalgaların amplitüd ve latensleri incelenmektedir. Latens, afferent yolun farklı basamaklarındaki akım hızını, amplitüd ise duyu inputunun sayısına karşılık, ortaya çıkan postsinaptik cevabı yansıtmaktadır [109].

MATERYAL VE METOT

3.1.Denekler

Çalışmamızda 90 adet dişi, genç, 200-250 gr arasında *Rattus norvegicus* Wistar sıçan (Tablo 3. 1) kullanılmıştır. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat gündüz siklusunda ve her kafeste 4 denek olacak şekilde sınırsız yem ve su ile beslenmişlerdir. Deney önc esinde bütün ratların normal yürümeleri kontrol edilmiştir, normal ol mayanlar da deney grubundan çıkarılmıştır. Tüm prosedürler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Kuruluna sunulmuş ve gerekli izinler alınmıştır (Hay. Den. Etik. Karar No:15).

3.2.Deney Grupları

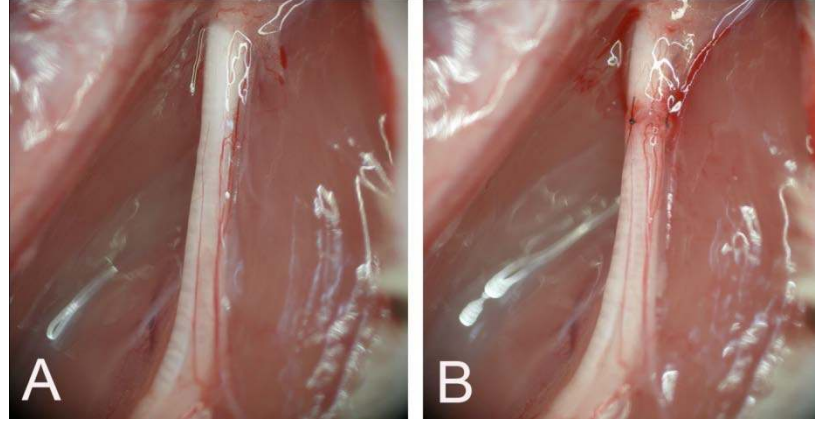
Çalışmamızda kullanılan denekler aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde sınıflanmıştır.

Tablo 3.1.Deney grupları

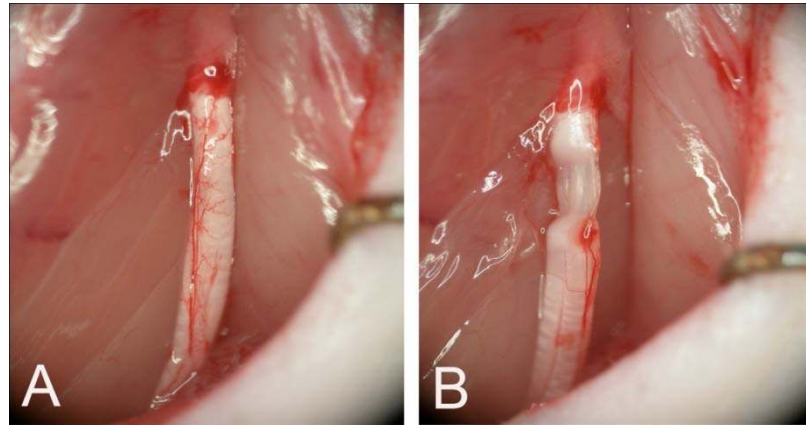
Grup Adı	Denek Sayısı	Hasar tipi	Melatonin miktarı
Grup 1 (Kontrol)	15	-	-
Grup 2 (Sham)	15	-	-
Grup 3 (Kesi)	15	kesi	-
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	15	kesi	50 mg/kg/gün
Grup 5 (Ezi)	15	ezi	-
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	15	ezi	50 mg/kg/gün

3.3.Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlem öncesinde deneğin, 15 mg/kg Xylazin HCl (Rompun®) ve 100 mg/kg K etamin'in (Ketalar®) intraperitoneal enjeksiyonu sonrası yeterli anestezisi sağlanmıştır. Daha sonra sol uyluk bölgesi yeterli oranda traşlanarak, flaster yardımıyla sol arka ekstremit ve kuyruk sabitlenerek uyluğun arka-yan kısmında longitudinal bir kesi uygulanmıştır. Makas veya penset yardımıyla gluteal kaslar ve biceps femoris kası arasından girilerek sol siyatik sinire ulaşılmıştır. Daha sonra uyluk ortasındaki bir seviyede cerrahi mikroskop altında siyatik sinirin total kesisi (Grup 3, 4) ve ezisi (Grup 5, 6) yapılmıştır (Şekil 3. 1). Siyatik sinir kesisi yapılmış olan denekler, sinir kesisinin uygulanmasından hemen sonra sinir uçları 10.0 dikiş materyali ile koapte edilmiştir. Sinir ezisi ise, bir hemostatik klemp (Aesculap, BH104H) yardımıyla sinirin 30 sn. süreyle ezilmesi (De Konning metod [110] ile sağlanmıştır. Standardizasyon amacıyla tüm ezi işlemleri aynı klemp ile yapılmış ve kl empin ucundan 0.5 cm uzaklıkta olacak şekilde siyatik sinir yerleştirilerek ezi uygulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1.Grup 3 ve 4; cerrahi işlem öncesi (A), cerrahi işlem sonrası (B)



Şekil 3.2.Grup 5 ve 6; cerrahi işlem öncesi (A), cerrahi işlem sonrası (B)

Cerrahi işlem sonrasında cilt derisi 2.0 dikiş materyali ile kapatılmış ve antiseptik solüsyon ile kesi bölgesi silinmiştir. Cerrahi operasyon sonrası ağrının dindirilmesi amacıyla Tramadol HCl (Contramal®) uygulanmıştır. Denekler her kafeste 4 adet olacak şekilde postoperatif bakım odasında sınırsız yem ve su verilerek iyileşmeye bırakılmıştır. Cerrahi işlemin uygulandığı gün 0. gün olarak değerlendirilmiştir. Tüm değerlendirme testleri bittikten sonra (6. hafta), siyatik sinir kesisi veya ezisi uygulanan alanın distal bölümü alınarak, biyokimyasal ve ultrastrüktürel analizlerde kullanılmıştır.

3.4.Melatonin Uygulaması

Kesi ve ezi sonrası Melatonin tedavisi uygulanmış gruplara (Grup 4 ve 6), 6 hafta boyunca saat 16:00-17:00 arasında günde bir kez melatonin intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Melatonin (Sigma; M 5250) etanolde çözülerek hazırlanmıştır. Her hayvana 50 mg/kg/gün olacak şekilde verilmiştir. Kontrol grubu hariç, diğer deney gruplarına ise (Grup 2, 3 ve 5) etil alkol içerisinde çözüldükten sonra, deneklere aynı hacimde olacak şekilde intraperitoneal verilmiştir. Böylece ölçülecek parametrelerde etanole bağımlı olabilecek olası değişiklikler her grup için bertaraf edilmiştir.

3.5.3.Elektrofizyolojik Değerlendirme

3.5.3.1.Somatosensoriyal Uyarılma Potansiyellerinin Kaydedilmesi

Deneklerin sakrifikasyonundan birgün önce somatosensoriyal uyarılma potansiyelleri e ter anestezisi altında hayvanların kafalarına yerleştirilen iğne elektrotları (NE-223S, 5 mm Nihon Kohden) ile Biopac MP 100 Data Acquisition cihazında kaydedilmiştir. Aktif elektrot s erebral korteksin s ol s omatosensoryal alanının üzerine (bregmanın 0.4 cm soluna), referans elektrot orta hatta bregmanın 1cm. önüne, toprak elektrodu hayvanın kuyruğuna yerleştirilmiştir. SEP kaydı için, ratın ayak bileğinden, sağ posterior tibial sinire transkutanöz yolla 3/sn kez sabit voltajlı kare dalga şeklinde elektriksel uyarı verilmiştir. Uyarı zamanı 0.5 ms. , analiz zamanı 150 ms. , örnekleme hızı 1 kHz. , yükseltecin bant genişliği 1-3000 Hz. , kazanç 50000 seçilmiştir. Kayıt sırasında sıçanların vücut sıcaklıkları 37-37.5 °C’de sabit tutulmuştur . SEP kaydı sırasında 200 cevabın ortalaması alınmış ve cevabın tekrar oluşabilirliğinden emin olmak için en az iki ortalama elde edilmiştir [112].

3.6.Deneklerin Sakrifikasyonu

Tüm fonksiyonel analizlerin ve 41. günün sonunda alınan SEP kayıtlarının tamamlanmasından sonra 42. postoperatif günde de nekler s akrifiye edilmiştir. Deneklerin 15 m g/kg Xylazin H Cl (Rompun®) ve 100 m g/kg Ketamin’in (Ketalar®) intraperitoneal enjeksiyonu ile yeterli anestezisi sağlandıktan sonra, göğüs bölgesi açılarak kalbe ulaşılmıştır. Transkardiyal perfüzyon işlemi için, kalbin sol ventrikülüne bir kanül yardımıyla girilip sağ atrium’a bir delik açılmıştır. Transkardiyal perfüzyon için, 250 ml heparinize serum fizyolojik ile vasküler yatak yıkanarak temizlendikten sonra aynı yolla tespit solüsyonu verilmiştir. Fiksasyon basamağında her bir hayvan için 250 ml 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanmış %4 paraformaldehit ve %2 glutaraldehit karışımı kullanılmıştır.

3.7.Ultrastruktürel Değerlendirme

3.7.1.Elektron Mikroskopik İnceleme

Altıncı haftanın sonunda, sakrifiye edilen deneklerden alınan siyatik sinir örnekleri, 0.1 M Sorenson fosfat tamponunda (pH 7.2) hazırlanmış %4’lük glutaraldehit solusyonunda + 4 °C ’de iki saat süreyle fikse edilmişlerdir. Fiksasyondan sonra, aynı tampon içinde yıkanan örnekler, %2’lik Osmium tetroksit (OsO₄) solusyonunda 1 saat bekletilerek postfiksasyon yapılmıştır. Örnekler, Etil alkol serisinden geçirilip dehidratasyonları sağlandıktan sonra Araldit CY212 içine gömülerek bloklanmışlardır. Bloklardan alınan 1 mikrometre kalınlığındaki yarı ince kesitler, %1’lik toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopta; 40 -60 nanometre kalınlığındaki ince kesitler ise elektron mikroskopik analiz için kontrastlanarak Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopik Görüntü Analiz Ünitesinde (TEMGA) bulunan TEM (Transmission Elektron Mikroskop, Zeiss LEO906E) mikroskobunda incelenmiştir.

3.8.Biyokimyasal Değerlendirme

3.8.1.Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Ölçümü

Bütün deney gruplarından tedavi bitiminde alınmış tam kan (kardiyak punktur) örneklerinden, plazma ayrılmış ve sıvı nitrojende hemen dondurularak

-80 °C’de analiz edilene kadar saklanmıştır. Sinir dokusunda lipid peroksidasyonunun ölçümü için deneklerin sakrifikasyonu sonrası, siyatik sinir diseke edilerek sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80 °C’de analiz edilene kadar saklanmıştır. Ölçüm öncesinde sinir dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenizatlar, +4 °C’de, 10000 x G’de, 15 dakika, santrifüj edilmiş, elde edilen süpernatantlarda lipid peroksidasyonu analiz edilmiştir.

Araştırmamızda lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için, tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) oluşumuna bakılmıştır. Tiyobarbitürik asit lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit (MDA) ile etkileşime girmektedir. TBARS yöntemi, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA teşkil etmesi, çok basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. TBARS ölçümleri, Wasowicz ve arkadaşlarının [113] yöntemine göre yapılmıştır.

Prensip: Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA’nın, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Reaktifler:

- 1- 29 mM tiyobarbitürik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit (Acetic acid glacial extra pure, Merck-56) içinde çözülmüştür.
- 2- 5 M HCl (Hidroklorik asit, Merck-314).
- 3- n-Bütanol (n-Butanol, Merck-329).
- 4- Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane, Sigma-T9889). Standart solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

İşlemler: 1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı veya 200 µl plazma konulduktan sonra, 1 ml tiyobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüpe iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra, 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000 x G’de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede (Perkin Elmer Luminescence Spectrometer, LS45) okunmuştur.

TBARS Miktarının Hesaplanması: 1, 1, 3, 3, -tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılmış ve standart grafiği oluşturulmuştur. Doku ve plazma TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak rapor edilmiştir.

3.9. Antioksidanların Tayini

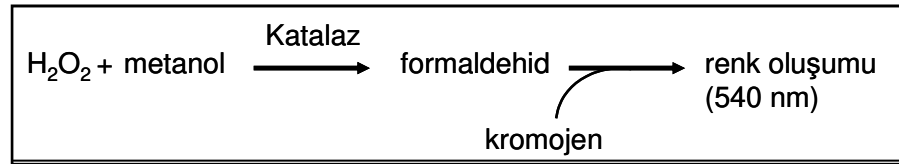
Bütün deney gruplarından tedavi bitiminde alınacak tam kan örneklerinden plazma ayrılmış ve sıvı nitrojende hemen dondurularak -80 °C’de analiz edilene

kadar saklanmıştır. Bu örneklerde, aşağıda belirtilen şekilde antioksidan enzimlerin ölçümü yapılmıştır. Sinir dokusunda antioksidanların ölçümü için, deneklerin sakrifikasyonu sonrası, siyatik sinir diseksiyonu yapılarak sıvı nitrojenle dondurulmuş ve -80 °C’de analiz edilene kadar saklanmıştır. Ölçüm öncesi sinir dokuları, hazırlanan tamponlarda buz üzerinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar, +4 °C’de 10000 x G’de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda antioksidan enzimler analiz edilmiştir.

3.9.1.Katalaz Enzim Aktivite Tayini

Katalaz enziminin hem katalitik, hem de peroksidatik aktivitesi mevcuttur. Katalitik aktivite H_2O_2 ’i moleküler oksijene ve suya çevirir. Peroksidatik aktivite ise düşük moleküler ağırlıklı alkoller okside ederek su oluşturur. Hidrojen peroksiti parçalayan enzim yalnızca katalaz değildir, ancak alifatik alkoller substrat olarak kullanılarak katalazdır. Bu sebeple, katalaz enzimin düzeyleri tayin edilirken, enzimin peroksidatik aktivitesine bakılmıştır. Ortama alkol olarak etanol konulmuş ve oluşan formaldehid, Purpald ile renk oluşumu ile reaksiyona sokularak renk oluşumu tayin edilmiştir.

Katalaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi:

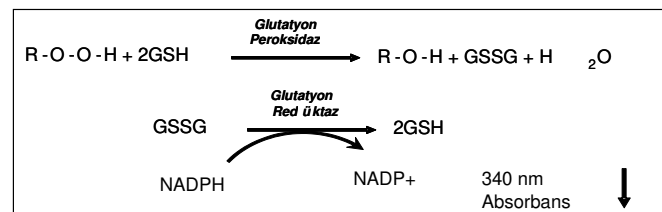


Katalaz enzimin aktivitesinin hesaplanması, oluşturulmuş formaldehid standard eğrisiyle yapılmıştır. Bir ünite katalaz aktivitesi, 1 dakikada oluşan μmol formaldehid olarak hesap edilmiştir.

3.9.2.Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini

Glutatyon peroksidaz enzimi, H_2O_2 dahil tüm hidroperoksitlerin redüksiyonunu sağlar. Bu işlevi sırasında da redükte glutatyonu kullanır. Oluşan okside glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenir. Bu indirgenme sırasında NADPH kullanılır ve $NADP^+$ oluşur. NADPH’nın reaksiyon ortamından kaybı 340 nm’de absorbans azalmasına neden olur ve bu azalmanın miktarından GPx enzimin aktivitesi tayin edilir. Glutatyon peroksidaz enzimin aktivitesinin hesaplanması, NADPH’nın 340 nm’deki extinction coefficienti ($0.00622 \mu\text{M}^{-1}$) değerinden yapılmıştır. Bir ünite GPx aktivitesi, 1 dakikada kullanılan μmol NADPH olarak hesap edilmiştir.

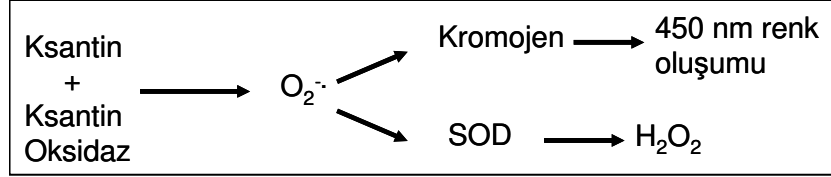
Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi:



3.9.3.Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz enzim aktivite tayini, kompetitif inhibisyon yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde reaksiyon ortamında, sürekli olarak süperoksit anyonu oluşturan ksantin oksidaz-hipoksantin sistemi mevcuttur. Bu sistemin açığa çıkardığı süperoksit anyonları, reaksiyon ortamına ilave edilen kromojeni indirger ve 450 nm’de ölçülebilen renk oluşumuna neden olur. Alınan örneklerde ne kadar SOD enzimi varsa, renk oluşumu o kadar az olur.

SOD enzim aktivitesinin tayin yöntemi:



Örneklerdeki SOD enzim aktivitesinin hesaplanması, oluşturulmuş SOD standard eğrisiyle yapılmıştır. Bir ünite SOD aktivitesi, maksimum renk oluşumunu %50 inhibe eden SOD miktarı olarak kabul edilmiştir.

3.10.Veri Analizi

Yürüme patern analizinden elde edilen veriler her bir grup için SFI olarak (ortalama ± standart sapma) hesaplandıktan sonra gruplar arasında istatistiksel anlamlılık için iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (student t), SFI verilerinin kaydedildiği günlerde gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (Post Hoc test olarak Tukey testi) kullanılmıştır. Pinch test verileri Ki-kare testi ile değerlendirilmiştir.

Elektrofizyolojik analizden elde edilen veriler ± standart hatası olarak değerlendirilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmada ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Biyokimyasal analizden elde edilen plazma, doku katalaz enzim aktiviteleri, GPx doku aktivitesi, doku SOD aktivitesi, plazma ve doku TBARS verileri, gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Tukey testi ile değerlendirildi. Plazma SOD ve GPx aktivite verileri gruplar arasındaki istatistiksel farklılık Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Dunn’s testi ile değerlendirildi.

Tüm istatistiksel analizler için SPSS (versiyon 11.0) programı kullanılmış ve anlamlılık düzeyi 0.05 veya 0.001 olarak belirlenmiştir.

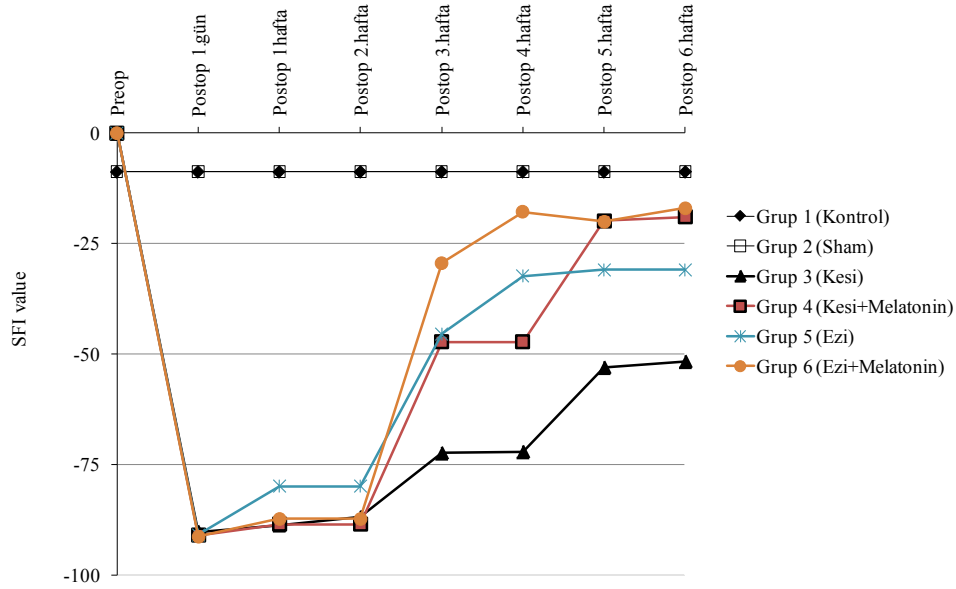
BULGULAR

4.1.SFI Değerleri

Kontrol ve Sham gruplarının SFI değerleri karşılaştırıldığında, verilerin elde edildiği günlerde iki grup arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Kesi uygulanan grupların SFI değerleri incelendiğinde, 1. postoperatif günde SFI değeri, Grup 3’de -91.01 ± 3.37 , Grup 4’de ise -91.63 ± 3.53 olarak tespit edildi. -50 SFI değerine ulaşılması Grup 4’de 21. postoperatif günde gerçekleşmiştir. Buna karşın, Grup 3 postoperatif 42. günün sonunda dahi SFI değerindeki -50’lik düzeye ulaşamamıştır (Şekil 4.1). 42. postoperatif gündeki SFI değerleri karşılaştırıldığında Grup 3 ve 4 arasında anlamlı farkın olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Grup 4 ile Sham grubu karşılaştırıldığında ise iki grup arasında anlamlı farkın olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, Melatonin tedavisinin yararlı bir etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

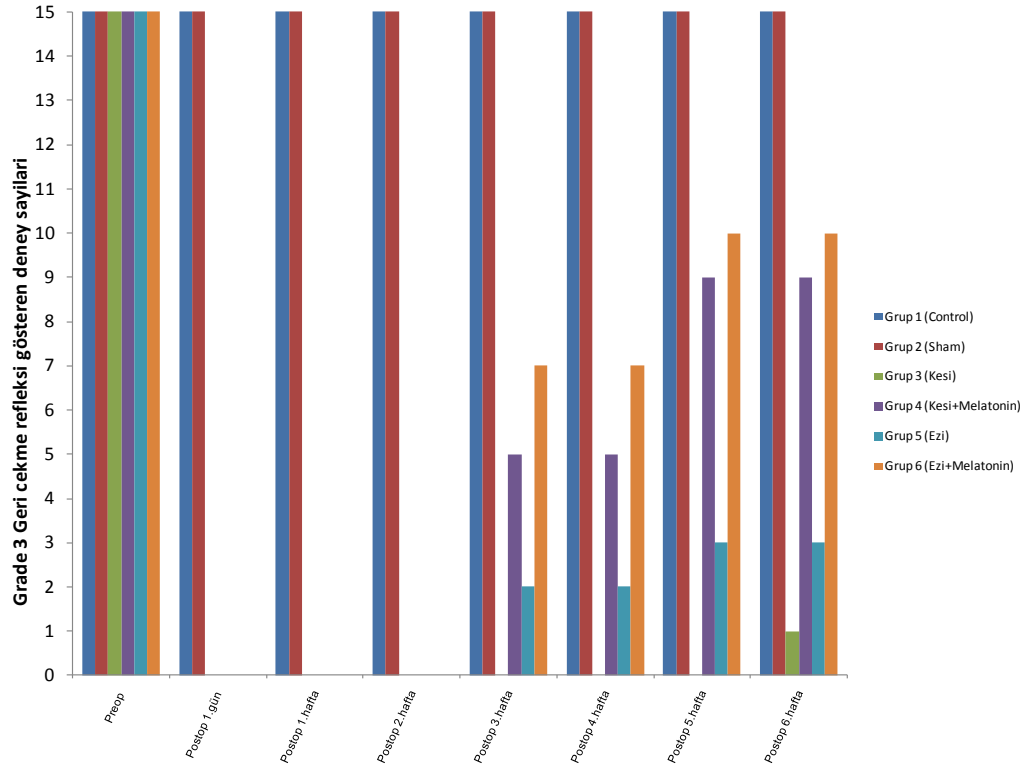
Ezi uygulanan grupların SFI değerleri incelendiğinde, 1. postoperatif günde SFI değeri Grup 6’da -91.36 ± 3.59 , Grup 5’de ise -90.95 ± 1.77 olarak tespit edilmiştir. -50 SFI değerine ulaşılması Grup 5 ve 6’da 21. postoperatif günde gerçekleşmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1.Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası elde edilen SFI değerleri

4. 2. Pinch Test Bulguları

Kontrol ve Sham gruplarında pinch test cevabı preoperatif ve postoperatif haftalarda tam geri çekme refleksi (Grade 3) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Deney gruplarında operasyon öncesi ve sonrası tam geri çekme refleksi (Grade 3) gösteren denek sayıları.

Grup 4' de tam geri çekme refleksi (Grade 3) 3. postoperatif haftada görülmeye başlanmıştır. Bu haftada bu cevabı gösteren denek sayısı, 5 olarak tespit edilmiştir. Bu grubun geri kalan deneklerinde ise orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) gözlenmiştir. Buna karşın, aynı postoperatif haftada Grup 3'deki deneklerden 12 denekte, hafif derecede geri çekme refleksi (Grade 1) varken, geri çekme refleksine cevap vermeyen (Grade 0) deneklerin sayısı ise 3'tür (Şekil 4.2). 3. postoperatif haftada Grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

6. postoperatif haftada Grup 4' de 6 denekten tam bir yanıt (Grade 3) alınmıştır. Buna karşın, Grup 3' de bulunan deneklerin sadece birinden tam bir geri çekme yanıtı (Grade 3) alınmıştır (Şekil 4.2). Bu postoperatif haftada pinch testine tam yanıt veren denek sayıları karşılaştırıldığında, Grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Grup 6' da tam geri çekme refleksi (Grade 3) 3. postoperatif haftada görülmeye başlanmıştır. Bu haftada bu cevabı gösteren denek sayısı 7 olarak tespit edilmiştir. Bu grubun geri kalan deneklerinde ise orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) gözlenmiştir. Buna karşın, aynı postoperatif haftada Grup 5' de 10 denekte orta derecede geri çekme refleksi (Grade 2) varken, geri kalan

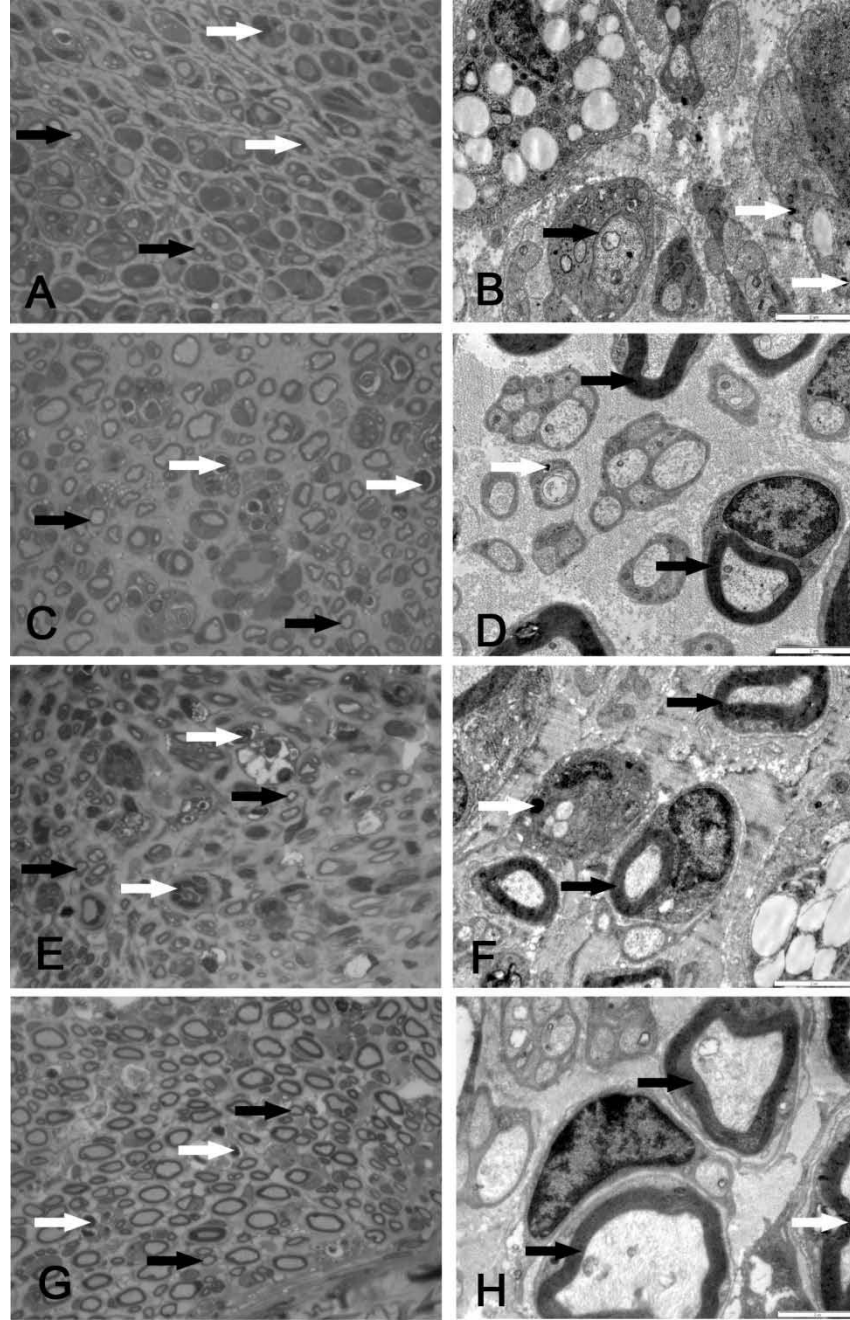
deneklerde ise hafif derecede geri çekme refleksi (Grade 1) gözlenmiştir (Şekil 4. 2). 3. postoperatif haftada Grup 5 ve 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

6. postoperatif haftada Grup 6' da 8 denekten tam bir geri çekme yanıtı alınmıştır. Buna karşın, Grup 5' de bulunan deneklerden sadece üçünden tam bir geri çekme yanıtı (Grade 3) alınmıştır (Şekil 4. 2). Bu postoperatif haftada da Grup 5 ve 6 arasında pinch teste tam yanıt veren denek sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$).

4.3. Işık ve Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Kontrol ve Sham gruplarının ışık mikroskopik değerlendirmesinde, myelinli ve myelinsiz sinir lifleri içeren normal bir siyatik sinir yapısı gözlenmiş ve myelinde formasyonu, hasarlanmış bir sinir lifi yapısına rastlanılmamıştır. Buna karşın, Grup 3'e ait örneklerde yoğun dejenerasyon ve ince remyelinize sinir liflerine rastlanmıştır. Grup 5'e ait örneklerde ise Grup 3'e göre daha az oranda dejenerasyon ve daha kalın çaplı remyelinize sinir lifleri gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Elektron mikroskopik değerlendirme sonucunda Kontrol ve Sham gruplarında ödemli bir görünüme, myelin ve akson hasarına rastlanmamıştır. Myelinli ve myelinsiz sinir liflerinin düzgün bir şekilde görüldüğü tespit edilmiştir. Grup 3 ve 5'te myelin rezidüsü içeren pek çok fagositik aktiviteye sahip hücreler (Makrofaj ve Schwann hücreleri) gözlenmiştir. Bu grubun, Grup 4 ve 6'ya kıyasla daha fazla oranda fagositik aktivite gösteren hücre infiltrasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Grup 4 ve 6'da yeni oluşmaya başlamış ince myelin kılıflara sahip çok sayıda myelinli sinir lifi gözlenmiştir. Bu myelin kılıflarının Grup 3 ve 5'e kıyasla daha kalın ve iyi formda görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Işık ve elektron mikroskopi bulguları. **A,B:** Grup 3 (Kesi), **C,D:** Grup 4 (Kesi + Melatonin), **E,F:** Grup 5 (Ezi), **G,H:** Grup 6 (Ezi + Melatonin), beyaz ok: myelin rezidüsü, siyah ok: remyelinize sinir lifi.

4.4. Elektrofizyolojik Analiz

SEP'lerin latenslerinin ortalama değerleri, standart hata sonuçları Tablo 4.1 verilmiştir. Sham grubu ile karşılaştırıldığında, Grup 3 ve 5' in tüm SEP bileşenlerinin (P_1 , N_1 , P_2 , N_2) latenslerinde, istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Grup 6' nın tüm SEP latenslerinin, Grup 5' e göre anlamlı düzeyde kısaldığı tespit edilmiştir. Grup 4' de de melatonin tedavisi sonrası, kesiye bağlı tüm SEP bileşenlerindeki latens uzamasının ortadan kalktığı, iki grup arasında anlamlı farkın olduğu saptanmıştır. Grup 4 ve 6 arasında, anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Tablo 4.1.Kontrol ve Deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP latensleri (ms)
(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Gruplar	P ₁	N ₁	P ₂	N ₂
Grup 1 (Kontrol)	21. 9±0.39	41. 9±0.52	62. 8±0.96	61.38±0.48
Grup 2 (S:Sham)	22. 2±0.77	42. 0±2.02	60. 12±2.0	79.44± 1.73
Grup 3 (K:Kesi)	34. 77±3.15 S**	54. 66±3.41 S*	76. 77± 2.88 S***	96.88±2.66 S***
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	21. 8±1 0 K **	38. 77±1.48 K **	57. 3 ±2.68 K***	75.1 ± 3.15 K***
Grup 5 (E:Ezi)	39. 12±2.39 S***	70. 5±1.99 S***	101. 2±4.30 S***	127.5± 6.86 S***
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	24. 0±1.39 E ***	36. 9±1.70 E ***	52. 2 ±2.63 E***	73.12±2.65 E***

SEP'lerin genliklerinin ortalama değeri, standart hata sonuçları Tablo 4. 2'de verilmiştir. Sham grubu ile karşılaştırıldığında, Grup 5' in SEP amplitüd değeri hepsinin (P₁N₁, N₁P₂, P₂N₂) anlamlı olarak arttığı, fakat Grup 3' ün amplitüd değeri ile Sham grubu arasında, anlamlı farkın olmadığı tespit edilmiştir. Grup 6' nin amplitüd değeri, Grup 5' e göre anlamlı olarak azaldığı, fakat Grup 4 ile Grup 3 ve 5 arasında, anlamlı farkın olmadığı saptanmıştır. Grup 4 ve 6 arasında, amplitüdlere açısından yapılan değerlendirmede anlamlı fark görülmemiştir.

Tablo 4.2.Kontrol ve Deney grubu hayvanlarından kaydedilen SEP genlikleri (μV)
(*p<0.05, **p<0.01)

Gruplar	P ₁ N ₁	N ₁ P ₂	P ₂ N ₂
Grup 1 (Kontrol)	2.62±0.18	1.44 ±0.27	2.13 ±0.16
Grup 2 (S:Sham)	2.76±0.19	1.10±0.16	2. 01±0.26
Grup 3 (K:Kesi)	3. 09±0.58	1.85± 0.35	2.12±0.24
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	1.73±0.19	1.71±0.12	1.94±0.21
Grup 5 (E:Ezi)	3.83±0.58 S**	3.16±0.47 S*	3.47±0.36 S**
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	1.94±0.23 E **	1.84±0.22 E*	1.78±0.23 E **

4.5.Biyokimyasal Değerlendirmeler

Katalaz enzim aktivitesi:

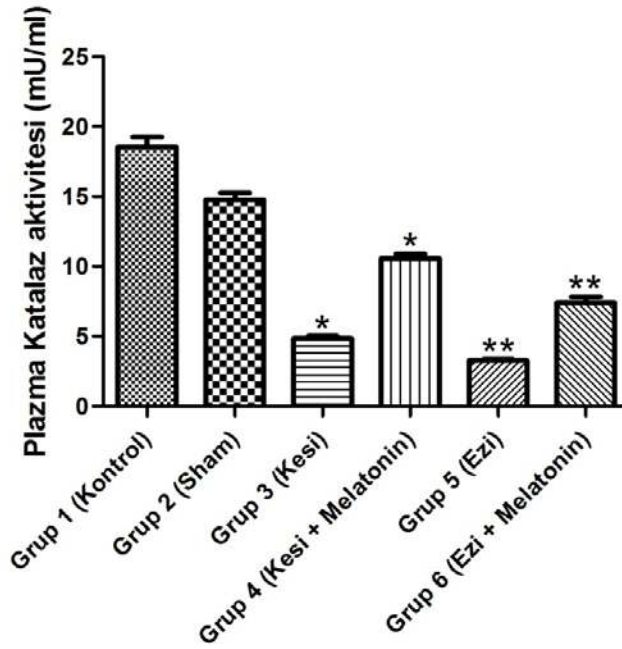
Kontrol ve Sham gruplarının plazma katalaz enzim aktivitesi Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Grup 4 ve 6'nın plazma enzim aktivitesinin Grup 3 ve 5'e göre yükseldiği gözlenmiştir ancak kontrol ve Sham grupları seviyesine ulaşmamıştır. Bu gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Bkz. Tablo 4.3, Şekil 4.4).

Tablo 4.3.Plazma katalaz enzim aktivite miktarı

GRUP	PLAZMA KATALAZ AKTİVİTESİ (mU/ml)
Grup 1 (Kontrol)	18.54 ± 1.58
Grup 2 (Sham)	14.77 ± 1.38
Grup 3 (Kesi)	4.83 ± 0.51 *
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	10.58 ± 0.86 *
Grup 5 (Ezi)	3.25 ± 0.29 **
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	7.38 ± 1.24 **

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.4.Plazma katalaz enzimi aktivite değerleri

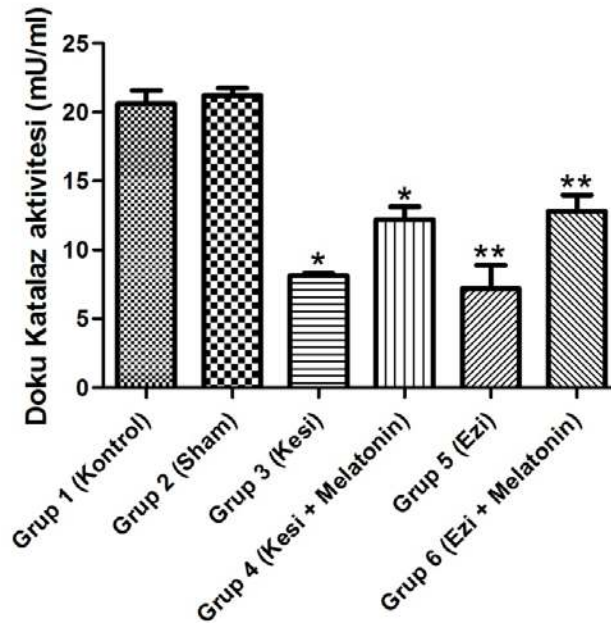
Kontrol ve Sham gruplarının doku katalaz enzim aktivesi Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Grup 4 ve 6'nın doku enzim aktivitesinin Grup 3 ve 5'e göre yükseldiği gözlenmiştir ancak kontrol ve Sham grupları seviyesine ulaşmamıştır. Bu gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 4.4, Şekil 4.5).

Tablo.4.4.Doku katalaz enzimi miktarı

GRUP	DOKU KATALAZ AKTİVİTESİ (mU/mg protein)
Grup 1 (Kontrol)	20.61 $\pm$ 1.67
Grup 2 (Sham)	21.21 $\pm$ 1.06
Grup 3 (Kesi)	8.14 $\pm$ 0.33 *
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	12.19 $\pm$ 1.90 *
Grup 5 (Ezi)	7.19 $\pm$ 1.70 **
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	12.82 $\pm$ 2.32 **

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.5.Doku katalaz aktivite değerleri

Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini:

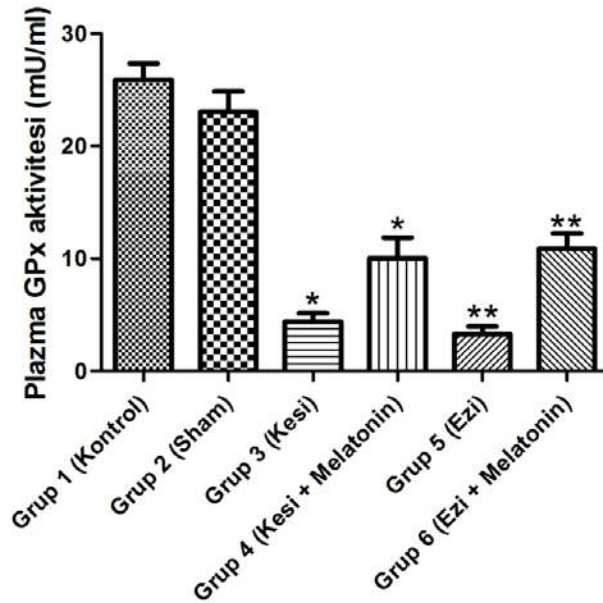
Grup 3 ve 5'in plazma GPx aktivitesi, Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Bkz. Tablo 4.5, Şekil 4.6). Buna karşın Grup 3 ve 5'in doku GPx aktivitesi, Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Dokuda keşi ve ezi uygulanan gruplarda melatonin tedavisinin GPx aktivitesini artırdığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.6, Şekil 4.7).

Tablo.4.5.Plazma GPx enzim miktarı

GRUP	Plazma GPx AKTİVİTESİ (mU/ml)
Grup 1 (Kontrol)	25.92 ± 1.43
Grup 2 (Sham)	23.04 ± 1.85
Grup 3 (Kesi)	4.38 ± 2.23 *
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	10.05 ± 5.07*
Grup 5 (Ezi)	3.30 ± 1.86 **
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	10.85 ± 3.82**

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



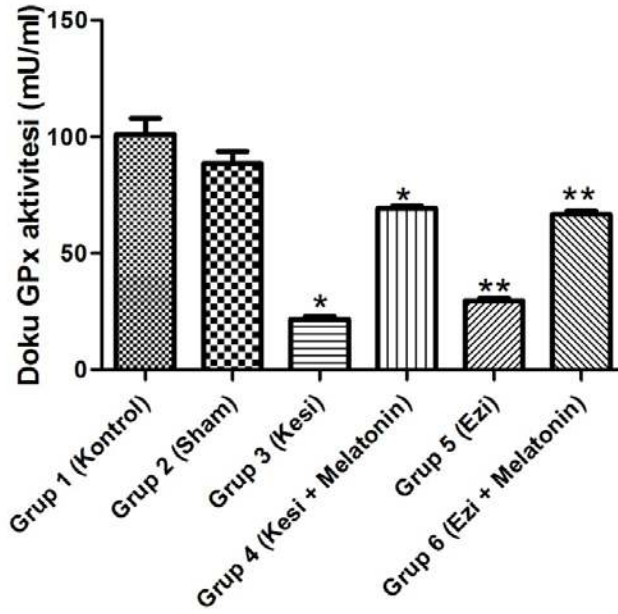
Şekil.4.6.Plazma GPx enzimi aktivite değerleri

Tablo.4.6.Doku GPx enzim miktarı

GRUP	DOKU GPx AKTİVİTESİ (mU/mg protein)
Grup 1 (Kontrol)	101.04 ± 6.86
Grup 2 (Sham)	88.48 ± 5.15
Grup 3 (Kesi)	21.66 ± 1.31 *
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	69.28 ± 1.07 *
Grup 5 (Ezi)	29.74 ± 1.11 **
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	66.65 ± 1.51 **

*, p<0.001 Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, p<0.001 Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.7. Doku GPx enzimi aktivite değerleri

Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini:

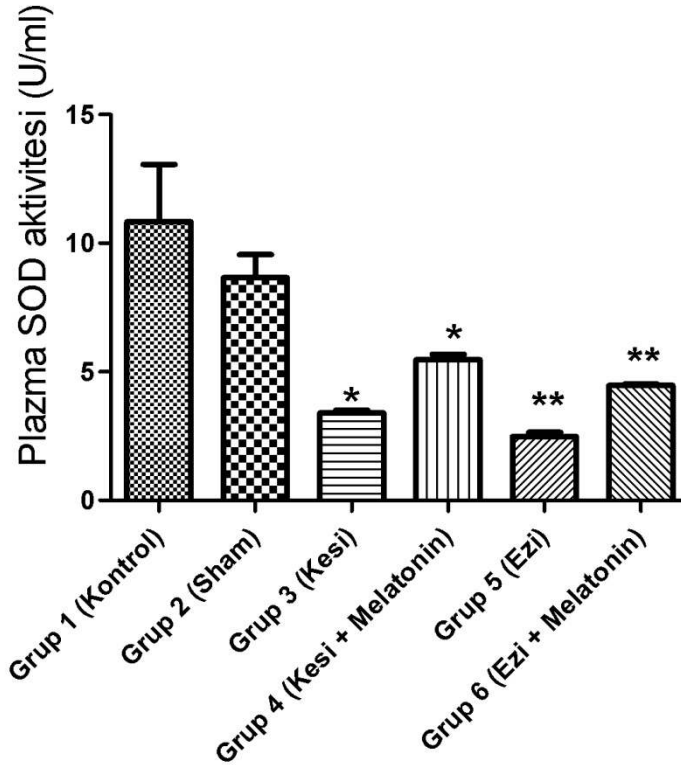
Grup 3 ve 5'in plazma SOD aktivitesi, kontrol ve Sham gruplarının plazma SOD aktivitesiyle kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalış görülmüştür ($p<0.001$), ancak melatonin tedavisi uygulanan kesi ve gruplarda plazma SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış görülmemiştir ($p>0.05$) (Bkz. Tablo 4.7, Şekil 4.8)

Tablo.4.7.Plazma SOD enzim miktarı

GRUP	PLAZMA SOD AKTİVİTESİ (U/ml)
Grup 1 (Kontrol)	10.83 ± 2.23
Grup 2 (Sham)	8.66 ± 0.90
Grup 3 (Kesi)	$3.40 \pm 0.11^*$
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	$5.47 \pm 0.21^*$
Grup 5 (Ezi)	$2.48 \pm 0.16^{**}$
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	$4.46 \pm 0.07^{**}$

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.8.Plazma SOD enzimi aktivite değerleri

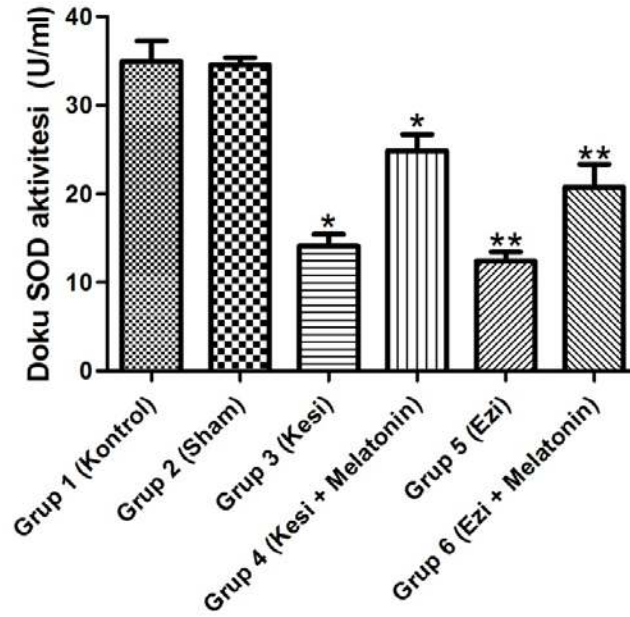
Melatonin tedavisi uygulanan kesi ve ezi grupları ile kesi ve ezi gruplarının doku SOD enzim aktivitesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Melatonin tedavisi uygulanan grubun doku SOD aktivitesi artmıştır (Bkz. Tablo 4.8, Şekil 4.9).

Tablo.4.8.Doku SOD enzim miktarı

GRUP	DOKU SOD AKTİVİTESİ (U/mg protein)
Grup 1 (Kontrol)	34.99 ± 2.31
Grup 2 (Sham)	34.59 ± 0.80
Grup 3 (Kesi)	14.12 ± 1.32 *
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	24.88 ± 1.86 *
Grup 5 (Ezi)	12.48 ± 1.04 **
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	20.76 ± 2.60 **

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.9.Doku SOD enzimi aktivite değerleri

Lipid Peroksidasyon Seviyeleri:

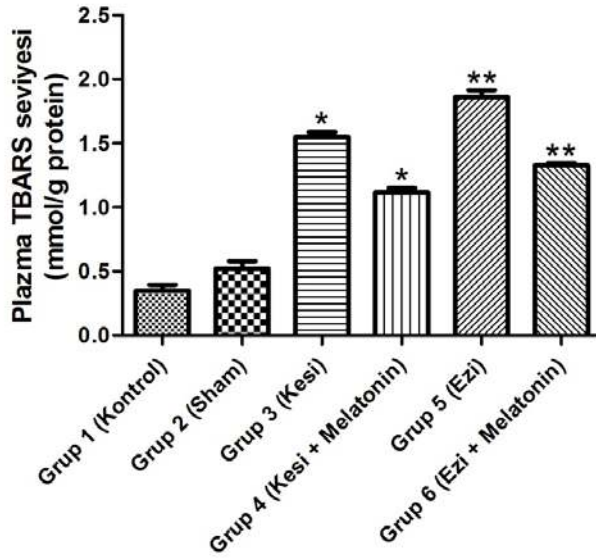
Grup 3 ve 5'in plazma TBARS miktarı, Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Bkz. Tablo 4.9). Plazma TBARS miktarında, Grup 4 ve 6'da, Grup 3 ve 5'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalma görülmüştür ($p<0.001$) (Bkz. Şekil 4.10).

Tablo.4.9.Plazma TBARS miktarı

GRUP	PLAZMA TBARS ($\mu\text{mol/L}$)
Grup 1 (Kontrol)	0.35 ± 0.10
Grup 2 (Sham)	0.52 ± 0.16
Grup 3 (Kesi)	$1.55 \pm 0.1^*$
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	$1.12 \pm 0.09^*$
Grup 5 (Ezi)	$1.86 \pm 0.16^{**}$
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	$1.33 \pm 0.06^{**}$

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.10.Plazma TBARS değerleri

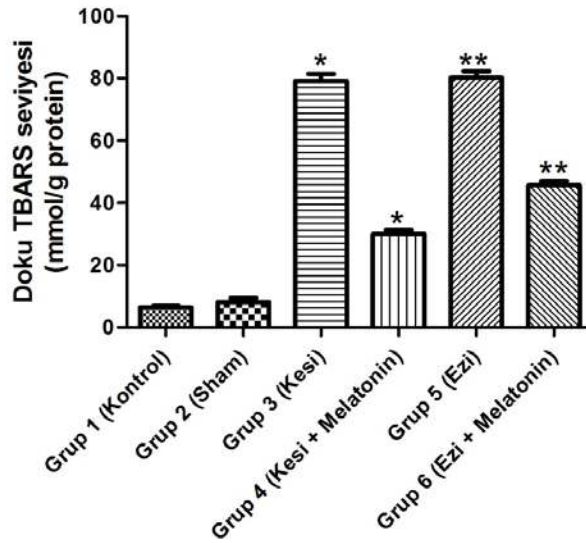
Grup 3 ve 5'in doku TBARS miktarı, Grup 4 ve 6 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$) (Bkz. Tablo 4.10). Dokuda ke si ve e zi u uygulanan gr uplarda, melatonin tedavisi TBARS miktarını azaltmıştır (Bkz. Şekil 4.11).

Tablo.4.10.Doku TBARS miktarı

GRUP	DOKU TBARS (mmol/g protein)
Grup 1 (Kontrol)	6.38 ± 0.82
Grup 2 (Sham)	8.11 ± 2.75
Grup 3 (Kesi)	$79.13 \pm 4.71 *$
Grup 4 (Kesi + Melatonin)	$30.01 \pm 2.73 *$
Grup 5 (Ezi)	$80.18 \pm 4.28 **$
Grup 6 (Ezi + Melatonin)	$45.60 \pm 2.70 **$

*, $p<0.001$ Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırıldığında

**, $p<0.001$ Grup 5 ile Grup 6 karşılaştırıldığında



Şekil.4.11.Doku TBARS değerleri

TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları, ekonomik ve sosyal aktivite kaybının sebeplerinden biridir [114]. Optimal cerrahi onarıma rağmen duyu ve motor fonksiyonların geri dönüşü zayıflar [114, 115]. Periferik sinir hasarlarının neden olduğu bu yetersizlik yaralanmanın tipi, onarım metodu [115, 116], yaralanmanın medulla spinalis'ten uzaklığı [117] ile yakından ilişkilidir. Zayıf fonksiyonel iyileşme, probleminin rejenerasyon sinir ve onun hedef kasında görülen anatomik ve fizyolojik değişikliklerle direkt olarak bağlı olabileceği vurgulanmıştır.

Sinir yaralanmalarından sonra fonksiyonel iyileşme başarılı sinir onarımı ile mümkündür. Bu da yaralanma süresi ve cerrahi onarım ve arasında geçen süre, cerrahi teknik, çeşitli büyüme faktörleri ve mediatörler, cerrahi sahasında skar dokusu oluşumu gibi birçok faktörler sinirin fonksiyonel iyileşmesine etki eder. Melatonininde bu mediatörlerden biridir, melatoninin iskemik rejenerasyon sırasında nöronda yeni liflerin oluşumunu arttırdığının ve myelin kılıftaki ödemi azalttığının görülmesi araştırmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur [118]. Ayrıca kuvvetli serbest radikal salınımını önleme etkisi, su ve lipidte çözülme özelliği melatoninin diğer mediatörlere göre farkını oluşturmaktadır. Ghaffar ve ark. [119] ezi melatonin yaralanma modelinde düşük doz (10 mg/kg) ve yüksek doz (50 mg/kg) melatonin tedavisini karşılaştırmışlar ve yüksek doz melatonin uygulamasının sinir koruyucu etkisini tespit etmişler. Bizde bu çalışmadaki melatonin dozundan yola çıkarak, kesi ve ezi yaralanma modelinde, yüksek doz (50 mg/kg) melatonin uyguladık ve bu dozun sinir rejenerasyonu üzerine olan olumlu etkisini tespit ettik.

Çalışmamızda melatoninin siyatik sinir dejenerasyonu üzerine yararlı etkisi elektron mikroskopik değerlendirme ve fonksiyonel testlerle gösterilmiştir. Bu analizlerde en çarpıcı bulgu siyatik fonksiyon indeksinin -50 değerinin Grup 4'de 21. postoperatif günde görülürken, Grup 3'de ise postoperatif 42. günün sonunda da görülmemesidir. Melatonin uygulaması sonrası antioksidan etki nedeniyle myelin kaybının önlenmesi ve böylece nöroprotektif bir etkinin oluşması muhtemeldir. Bu nedenle, Grup 4'ün Grup 3'e göre -50 SFI değerine ulaşılmasının bu nöroprotektif etkinin bir kanıtı olduğunu düşünmekteyiz. Atik ve ark. [120] melatonin etkisini gözlemlemek amacı ile deneysel siyatik sinir kesisi modeli oluşturmuşlardır. Çalışmanın yürüme analizinde, SFI değerlendirilmesinde 4. haftada hiç bir grupta önemli bir değişiklik gözlenmemiş 12. haftada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, grup 6'da postoperatif 3. haftada, grup 4'de ise postoperatif 6. haftada SFI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir.

Dağlıoğlu ve ark. [121] siyatik sinir ezisi sonrası melatonin uygulamasını takiben yaptıkları elektron mikroskopik çalışmalarında, melatonin uygulanan grupta myelin kılıflarının korunduğu, axonlarda herhangi bir değişikliğin olmadığını bulmuşlar ve sonuç olarak melatoninin nöral iyileşmeyi geliştirdiğini

tespit etmişlerdir. Sayan ve ark. [122], siyatik sinire uyguladıkları 2 saatlik iskemi ve arkasından 3 saatlik reperfüzyon uygulanmasından sonra melatonin verdikleri çalışmalarında siyatik sinirde, daha az ödem ve daha az myelin kılıf hasarı tesbit etmişlerdir. Bu bulgular, bizim elektron mikroskopik bulgularımız ile uyumludur. Bizim çalışmamızda da grup 4 ve 6'da myelin rezidüsü içeren fagositik aktiviteye sahip hücrelerin (makrofaj ve Schwann hücreleri) azaldığı ayrıca, yeni oluşmaya başlamış ince myelin kılıflara sahip çok sayıda myelinli sinir lifi gözlenmiştir.

Turgut ve ark. [123] siyatik sinir kesiminden sonraki 8. haftada elektron mikroskopik olarak, sinir onarım sahasında eksojen melatonin uygulamasının kollagen birikimini azaltarak, nöroma oluşumunu belirgin derecede inhibe ettiğini göstermişlerdir. Çalışmada, melatonin ve riley ganglionunda kesim yerindeki myelin lamellerindeki erimenin azaldığı, myelin kılıfların daha az hasar gördüğü, axoplazmadaki nörofilaman ve nöro tübüllerin daha az biriktiği ve daha az kollagen birikimi, daha az intranöral skar dokusu, daha az proliferasyon ve daha iyi lif dizilimi gözlemlenmiştir. Sinir iyileşmesinin histolojik bulgularında, 8. haftada iyi bir axonal rejenerasyon sağladığını saptamışlardır. Çalışmamızda ise bu etki grup 4 ve 6'da 6. haftada saptanmıştır.

Sinirde hasar olduğu zaman, sinirin iyileşme sürecini izlemek için SEP gibi elektrofizyolojik kayıtlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Pek çok çalışmada, opere edilen sinir bölgesi ile sağlam sinirin olduğu taraftan alınan SEP kayıtları, latens ve amplitüd değerleri açısından karşılaştırılmaktadır [124, 125]. Çalışmamızda, grup 3 ve 5'de, iyileşmenin var olup olmadığı ve tedavi edici ajan olarak kullanılan melatoninin etkisini gösterebilmek amacıyla, sıçanlardan SEP kayıtları alınmıştır.

Kawakami ve ark. [126] radial sinir basısı yapılan deneklerde, SEP amplitüdlerinin arttığını tespit etmişlerdir. Jou ve ark. [127] ise siyatik sinirin basıya bağlı hasarından 3 saat sonra aldıkları spinal SEP kayıtlarında, bütün dalga formlarının amplitüdlerinin azaldığını, latenslerinin ise arttığını tespit etmişlerdir. Bizde çalışmamızda Jou ve arkadaşlarının [127] sonuçlarına benzer şekilde, grup 5'de latenslerin uzadığını fakat amplitüdlere Kawakami ve arkadaşlarının [126] sonuçlarına benzer şekilde belirgin olarak arttığını tespit ettik. SEP amplitüdlerindeki artış ve azalışı iki parametre belirlemektedir: 1) Nöronal eksitabilite örneğin, aktive hücre sayısı, 2) Uyarılan bölgenin, somatosensoriyal kortekste etkilediği alanın büyüklüğü [109]. Grup 5'de meydana gelen amplitüd artışı, ezi uygulanan yerin etrafında bulunan komşu sağlam sinir kollaterallerinin varlığıyla açıklanabilir, çünkü bu durumda uyarılan kortikal alanın büyüklüğü, dolayısıyla SEP amplitüdlere artmış olacaktır kanaatindeyiz. Ayrıca melatonin tedavisiyle eziye bağlı olarak artmış SEP amplitüd değerleri de kontrol düzeylerine inmiştir. Yapılan literatür taramasında sinir hasarında, SEP amplitüd değerlerinde olan değişikliklere, melatoninin nasıl etki edeceğine ilişkin bir bilgiye rastlanmamış olup, SEP amplitüdlerinin normale dönmesinin, melatoninin antioksidan ve nöroprotektif etkisine bağlı olarak, sinir rejenerasyonunun hızlanması ve stimülasyon uygulanan bölgenin etrafında yeni kollateral oluşumlarına gerek kalmaksızın, uyarının gerekli kortikal alana projekte olabileceği ile açıklanabilir. Grup 4 ve 6'da ise amplitüdlere anlamlı bir

değişiklik olmadığı gözlenmiş, sinir kesisi ile ilgili yapılan literatür taramasında SEP dalga formlarında, amplitüd değişimlerini ifade eden bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Siyatik sinir basısı ile ilgili yapılan bir çalışmada ise ezi sonrası, değişen dozlarda melatonin tedavisi uygulanmış ve sinir ileti hızı ve latens değerlendirildiğinde, latens değerlerinin, ezi grubunda belirgin olarak arttığı, melatonin tedavisini takiben, latenslerin anlamlı düzeyde kısaldığı tespit edilmiştir [128]. Bilindiği üzere sinir ileti hızı yavaşladığında, SEP latensleri uzamaktadır [109]. Nitekim çalışmamızda, literatürdeki çalışmaları destekler nitelikte grup 3 ve 5’de, SEP latenslerinin bütün komponentlerinde belirgin artış olduğu ve bu artışın, nöroprotektif etkileri melatonin sayesinde grup 4 ve 6 ‘da kontrol değerlerine döndüğü tespit edilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda melatonin SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerle olan ilişkisi olduğu belirtilmiştir [100, 129, 130]. Bizim bulgularımız da bu verileri desteklemektedir.

Dağlıoğlu ve arkadaşlarının [121] yaptığı çalışmada, siyatik sinir yaralanmasında melatonin tedavisi intraperitoneal olarak uygulanmış, biyokimyasal analiz sonucunda tedavi uygulanan grubun lipid peroksidasyonunda azalma tespit edilmiştir. Shokouhi ve arkadaşlarının [119] çalışmasında ise, siyatik sinir ezi yaralanma modelinde, yüksek doz (50 mg/kg) melatonin uygulanmış, bu dozun, lipid peroksidasyon seviyesini ve ezi sonrasında meydana gelen, periferik nöronal fibrillerindeki peroksidatif hasarı azalttığı belirtmiştir. Bizde çalışmamızda grup 3 ve 5 ‘in doku lipid peroksidasyonunda kontrol ve S ham gruplarına oranla 12.5 kat ($p<0.001$) artış gözlemlerken, grup 4 ve 6 ‘da anlamlı ($p<0.001$) derecede azalma tespit ettik.

Sayan ve ark. [122] siyatik sinir yaralanması sonucunda melatonin tedavisi uygulanan grupta, MDA miktarında azalma SOD miktarında ise artma tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da grup 4 ve 6 ‘nın, MDA miktarında belirgin bir azalış ($p<0.001$), doku SOD miktarında ise grup 3 ve 5 ‘e oranla % 70’lik bir artış tespit ettik ($p<0.001$).

Yapılan çalışmalarda, melatoninin tedavisinin SOD, CAT, GPx enzim miktarlarının artışını stimüle ettiği belirtilmiştir [131, 132]. Biz de grup 3 ve 5 ‘in doku GPx ve CAT enzim miktarlarını grup 4 ve 6 ile kıyaslayınca yaklaşık olarak % 164 (GPx, $p<0.001$) ve % 64 (CAT, $p<0.005$)’lük anlamlı bir artış tespit ettik. Melatonin tedavisi sonucunda tüm bu antioksidan enzim miktarlarındaki artışın ve MDA miktarındaki azalmanın, melatoninin olası antioksidan etkisi sonucu görüldüğü kanaatindeyiz.

SONUÇLAR

Son yıllarda melatoninin güçlü bir antioksidan olduğunu bildiren pek çok yayın vardır ayrıca serbest radikallerin bulunduğu sayısız modellerde, dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı azalttığı bulunmuştur.

Çalışmamızda fonksiyonel, elektrofizyolojik, biyokimyasal ve elektromikroskopik düzeyde melatoninin, periferik sinir kesisi ve ezisi sonrası morfolojik hasarı onarmada etkili olduğunu gözlemledik, özellikle bu iyileşmenin 6. haftada maksimum düzeye ulaştığını tespit ettik.

Melatonin nöroprotektif etkisinin deneysel sinir yaralanmalarında başarılı olduğu, ancak klinikte, uygun doz ve muhtemel yan etkilerin iyi araştırılması gerekmektedir.

Eksojen melatonin verilmesinin gelecekte periferik sinir tedavisinde iyileşmesinde alternatif bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, melatoninin periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki bu etkilerinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği konusunda ileri düzeyde araştırmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Brushart TM (1998) Nerve repair and grafting. In Gren DP (ed.): Operative Hand Surgery. Fourth ed, Churchill Livingstone Inc. , pp. 1381-403.
2. Cecchini T , Cuppini R , Ciaroni S , De Matteis R , Del Grande P (1994) Increased number of sciatic sensory neurons in vitamin-E-deficient rats. Somatosens Mot Res. 11:269-78.
3. Cuppini R, Cecchini T, Ciaroni S, Ambrogini P, Del Grande P (1993) Nodal and terminal sprouting by regenerating nerve in vitamin E -deficient rats. J Neurol Sci. 117:61-7.
4. Sewerynek E , Abe M , Reiter R J, et al. (1995) Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. J Cell Biochem. 58:436-44.
5. Taylor GI, Ham FJ (1976) The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. Plast Reconstr Surg. 57:413-26.
6. Kater SB, Mills LR (1991) Regulation of growth cone behavior by calcium. J Neurosci. 11:891-9.
7. Stys PK, Ransom BR, Waxman SG (1990) Effects of polyvalent cations and dihydropyridine calcium channel blockers on recovery of CNS white matter from anoxia. Neurosci Lett. 115:293-9.
8. Anneser JM, Berthele A, Borasio GD, Castro-Lopes JM, Zieglgansberger W, Tolle TR (2000) Axotomy of the sciatic nerve differentially affects expression of metabotropic glutamate receptor mRNA in adult rat motoneurons. Brain Res. 868:215-21.
9. Decosterd I, Allchorne A , Woolf CJ (2002) Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. Pain. 100:155-62.
10. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 43:205-18.
11. Wall PD, Devor M , Inbal R , et al. (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. Pain. 7:103-11.
12. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S , et al. (1994) Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. Pain. 56:9-16.
13. DeLeo JA, Yezierski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. Pain. 90:1-6.
14. Shimoyama M, Tanaka K, Hasue F, Shimoyama N (2002) A mouse model of neuropathic cancer pain. Pain. 99:167-74.
15. Sarikcioglu L, Demirel BM, Demir N , Yildirim FB, Demirtop A, Oguz N (2008) Morphological and ultrastructural analysis of the watershed zones after stripping of the vasa nervorum. Int J Neurosci. 118:1145-55.
16. Wang LX, Wang ZJ (2003) Animal and cellular models of chronic pain. Adv Drug Deliv Rev. 55:949-65.

39. Fischer DW, Beggs JL, Kenshalo DL, Jr., Shetter AG (1985) Comparative study of microepineurial anastomoses with the use of CO₂ laser and suture techniques in rat sciatic nerves: Part 1. Surgical technique, nerve action potentials, and morphological studies. *Neurosurgery*. 17:300-8.
40. Kappers JA (1976) The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir (Wien)*. 34:109-49.
41. Reiter RJ (1981) The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat*. 162:287-313.
42. Erlich SS, Apuzzo ML (1985) The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg*. 63:321-41.
43. Reiter RJ (1991) Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 79:C153-8.
44. Calvo J, Boya J (1984) Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. *J Anat*. 138 (Pt 1):45-53.
45. Calvo J, Boya J (1984) Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. *J Anat*. 138 (Pt 3):405-9.
46. Calvo J, Boya J, Borregon A, Garcia-Maurino JE (1988) Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat Rec*. 220:424-8.
47. Calvo JL, Boya J, Garcia-Maurino JE (1990) Ultrastructural changes in the rat pineal gland after sympathetic denervation. Quantitative study. *Histol Histopathol*. 5:155-60.
48. Altun A, Ugur-Altun B (2007) Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract*. 61:835-45.
49. Reiter RJ (1996) The indoleamine melatonin as a free radical scavenger, electron donor, and antioxidant. In vitro and in vivo studies. *Adv Exp Med Biol*. 398:307-13.
50. Cardinali DP, Rosner JM (1971) Metabolism of serotonin by the rat retina in vitro. *J Neurochem*. 18:1769-70.
51. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH, 3rd, Iuvone PM, Tosini G (2004) Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res*. 315:197-201.
52. Cagnacci A (1996) Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res*. 21:200-13.
53. Palaoğlu ÖS, Beşkonaklı E (1998) Pineal Bez ve Yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*. 1:1:13-8.
54. Koch BC, Nagtegaal JE, Kerkhof GA, ter Wee PM (2009) Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 5:407-16.
55. Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR (2006) Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian J Med Sci*. 60:523-35.
56. Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Zabel M (2008) Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Med Sci Monit*. 14:RA64-70.
57. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I (2001) In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol*. 75:88-96.

58. Lerchl A (2002) Biological rhythms in the context of light at night (LAN). *Neuro Endocrinol Lett.* 23 Suppl 2:23-7.
59. Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Calvo JR, et al. (2007) Melatonin as pharmacologic support in burn patients: a proposed solution to thermal injury-related lymphocytopenia and oxidative damage. *Crit Care Med.* 35:1177-85.
60. Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP, et al. (2007) The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma. *J Pineal Res.* 42:1-11.
61. Piotrowska A, Izykowska I, Podhorska-Okolow M, Zabel M, Dziegiel P (2008) The structure of NF- κ B family proteins and their role in apoptosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 62:64-74.
62. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 28:193-202.
63. Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS (2002) Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 20:2575-601.
64. Ekmekcioglu C (2006) Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother.* 60:97-108.
65. Barber DA, Harris SR (1994) Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm.* NS34:26-35.
66. Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 49:481-93.
67. McCord JM (1993) Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 26:351-7.
68. Brunori M, Rotilio G (1984) Biochemistry of oxygen radical species. *Methods Enzymol.* 105:22-35.
69. Weiss SJ (1986) Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl.* 548:9-37.
70. Bilinski T, Litwinska J, Blaszczyński M, Bajus A (1989) Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1001:102-6.
71. Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23:134-47.
72. Klebanoff SJ (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 93:480-9.
73. Reiter RJ (1998) Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 56:359-84.
74. McCord JM, Day ED, Jr. (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* 86:139-42.
75. Karbownik M, Reiter RJ (2000) Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 225:9-22.
76. Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 344:721-4.
77. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119:598-620.

78. Halliwell B (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 70:737-57.
79. Simonian N A, C oyle JT (1996) O xidative s tress i n ne urodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36:83-106.
80. Basaga HS (1990) Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* 68:989-98.
81. Akkuş İ (1995) Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Konya, Mimoza yayınları, p. 134.
82. Dreher D , Junod A F (1996) R ole of ox ygen f ree r adicals i n c ancer development. *Eur J Cancer.* 32A:30-8.
83. Igari T , K aneda H, H oriuchi S , O no S (1982) A r emarkable i ncrease of superoxide di smutase a ctivity i n s ynovial fluid of patients w ith r heumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res.*282-7.
84. Erden M (1992) Serbest radikaller *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 12:201-7.
85. Winrow V R, W inyard PG, M orris C J, B lake DR (1993) F ree r adicals i n inflammation: s econd m essengers a nd m ediators of t issue de struction. *Br Med Bull.* 49:506-22.
86. Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-26.
87. Fridovich I (1997) Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272:18515-7.
88. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244:6049-55.
89. Kajihara J, Enomoto M, Katoh K, Mitsuta K, Kohno M (1990) Relationship between t he l igand s tructure of c opper a nd t he s tability o f superoxide dismutase. *Agric Biol Chem.* 54:495-9.
90. Salin ML, McCord JM (1975) Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosine leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest.* 56: 1319-23.
91. Guemouri L, A rtur Y , H erbeth B, J eandel C , C uny G, S iest G (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 37:1932-7.
92. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW, Jr. (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem.* 184:193-9.
93. Shimizu N , K obayashi K, H ayashi K (1984) The r eaction of s uperoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J Biol Chem.* 259:4414-8.
94. Sies H , S tahl W (1995) V itamins E a nd C , b e ta-carotene, a nd ot her carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 62:1315S-21S.
95. Aydın A, Sayal A, Işimer A (2001) Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 75.
96. Balcıoğlu A (1993) Nitrik Oksit: Yeni Biyolojik İkincil Haberci. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 13:31-45.
97. Nolte J (1988) The Human Brain. An introduction to its functional anatomy. 2nd ed. St. Louis: The C. V. Mosby Company, 64-78.

98. Carpenter M B (1991) Core Text of Neuroanatomy. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
99. Kaas JH (1983) What, if anything, is SI? Organization of first somatosensory area of cortex. *Physiol Rev.* 63:206-31.
100. Martin JH, T.M. J (1991) Anatomy of the somatic sensory system. In Kandel ER, J.H. S, T.M. J (eds.): *Principles of Neural Science*. 3rd ed. New York, Elsevier, pp. 353-66.
101. Merzenich M M, Kaas J H (1980) Principles of organization of sensory-perceptual systems in mammals. In Sprague JM, Epstein AN (eds.): *Progress in psychobiology and physiological psychology*. New York, pp. 1–42.
102. Nakanishi T, Takita K, Toyokura Y (1973) Somatosensory evoked responses to tactile tap in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 34:1-6.
103. Pratt H, Starr A (1981) Mechanically and electrically evoked somatosensory potentials in human: scalp and neck distributions of short latency components. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 51:138-47.
104. Dawson G D (1947) Cerebral Responses to Electrical Stimulation of Peripheral Nerve in Man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 10:134-40.
105. Cunningham K, Halliday AM, Jones SJ (1986) Simulation of 'stationary' SAP and SEP phenomena by 2-dimensional potential field modelling. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 65:416-28.
106. Panjwani G D, Mustafa MK, Muhailan A, Aneja IS, Owunwanne A (1991) Effect of hyperthermia on somatosensory evoked potentials in the anaesthetized rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 80:384-91.
107. Çakmur R (1993) Sensorimotor Korteks Alanlarının Fonksiyonel Anatomisinin değerlendirilmesinde Median Sinir Kortikal Somatosensoriyel Uyarılmış Potansiyelleri. *Uzmanlık Tezi, İzmir.*
108. Öge AE, Yayla V Nöroloji. Uyandırılmış potansiyeller. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004, pp. 149-54.
109. Canu M H, Langlet C, Dupont E, Falempin M (2003) Effects of hypodynamia-hypokinesia on somatosensory evoked potentials in the rat. *Brain Res.* 978:162-8.
110. De Koninck P, Rakke JH, Gispén WH (1986) Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci.* 74:237-46.
111. Bain J R, Mackinnon SE, Hunter D A (1989) Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 83:129-38.
112. Kucukatay V, Agar A, Yargicoglu P, Gumuslu S, Aktekin B (2003) Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health.* 58:14-22.
113. Wasowicz W, Nève J, Peretz A (1993) Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem.* 39:2522-6.

114. Dagum AB (1998) Peripheral nerve regeneration, repair, and grafting. *J Hand Ther.* 11:111-7.
115. Glickman LT, Mackinnon SE (1990) Sensory recovery following digital replantation. *Microsurgery.* 11:236-42.
116. Gul S, Celik SE, Kalayci M, Tasyurekli M, Cokar N, Bilge T (2005) Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimental spinal cord injury in rats. *Surg Neurol.* 64:355-61.
117. Crews LL, Wigston DJ (1990) The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. *J Neurosci.* 10:1643-53.
118. Turgut M, Uyanikgil Y, Baka M, et al. (2005) Pinealectomy exaggerates and melatonin treatment suppresses neuroma formation of transected sciatic nerve in rats: gross morphological, histological and stereological analysis. *J Pineal Res.* 38:284-91.
119. Shokouhi G, Tubbs RS, Shoja MM, et al. (2008) Neuroprotective effects of high-dose vs low-dose melatonin after blunt sciatic nerve injury. *Childs Nerv Syst.* 24:111-7.
120. Atik B, Erkutlu I, Tercan M, Buyukhatipoglu H, Bekerecioglu M, Pence S (2011) The effects of exogenous melatonin on peripheral nerve regeneration and collagen formation in rats. *J Surg Res.* 166:330-6.
121. Daglioglu E, Serdar Dike M, Kilinc K, et al. (2009) Neuroprotective effect of melatonin on experimental peripheral nerve injury: an electron microscopic and biochemical study. *Cen Eur Neurosurg.* 70:109-14.
122. Sayan H, Ozacmak VH, Ozen OA, et al. (2004) Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. *J Pineal Res.* 37:143-8.
123. Turgut M, Uysal A, Pehlivan M, Oktem G, Yurtseven ME (2005) Assessment of effects of pinealectomy and exogenous melatonin administration on rat sciatic nerve suture repair: an electrophysiological, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Acta Neurochir (Wien).* 147:67-77.
124. Roth J, Shtokman J, Shamir MH, et al. (2011) Regeneration of the transected rat sciatic nerve after suturing or adhesion with cyanoacrylate glue. *J Neurosurg.* 114:245-52.
125. Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M (2001) Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg.* 17:133-7; discussion 8.
126. Kawakami Y, Suzuki H, Dong WK (1989) Assessment of peripheral nerve crush injury with cortical somatosensory evoked potentials in the cat. *Exp Neurol.* 103:146-53.
127. Jou IM, Chang PJ, Wu HH, et al. (2004) A long-term analysis of the spinal somatosensory evoked potential of rats with sciatic constriction injury. *Acta Anaesthesiol Taiwan.* 42:69-76.
128. Zencirci SG, Bilgin MD, Yaraneri H (2010) Electrophysiological and theoretical analysis of melatonin in peripheral nerve crush injury. *J Neurosci Methods.* 191:277-82.
129. Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Sui AW, Garcia JJ (2000) Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res.* 29:54-61.

- 130.**Rodriguez C , Mayo J C, Sainz R M, et al. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res. 36:1-9.
- 131.**El-Abhar HS, Shaalan M, Barakat M , El-Denshary E S (2002) Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy fuels in the blood and brain of global ischemic rats. J Pineal Res. 33:87-94.
- 132.**Mennenga K, Ueck M, Reiter RJ (1991) Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. J Pineal Res. 10:159-64.

ÖZGEÇMİŞ

Yasemin Kaya 16 . 08. 1979 tarihinde Şanlıurfa’da doğdu. İlköğrenimini Vatan İlkokulunda, ortaöğrenimi Orhangazi ortaokulunda tamamladı. 1997 yılında Şanlıurfa Lisesinden mezun oldu. Lisans öğrenimini 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi F en-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. Aynı yıl Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Biyokimya Yüksek Lisans Programına başladı ve bu programı 2004 yılında tamamladı. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Anatomi Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı’nda Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.