



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAYGIN BEYİN HASARI SONRASINDA PİOGLİTAZON'UN
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

HAZIRLAYAN: İŞİL AYDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ

DANIŞMAN
PROF. DR. KAMİL VURAL

İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET İBRAHİM TUĞLU

MANİSA-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAYGIN BEYİN HASARI SONRASINDA PİOGLİTAZON'UN
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

HAZIRLAYAN: İŞİL AYDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ

DANIŞMAN
PROF. DR. KAMİL VURAL

İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET İBRAHİM TUĞLU

PROF. DR. KAMİL VURAL
PROF. DR. ERCÜMENT ÖLMEZ (Üye)
PROF. DR. BAŞAR SIRMAGÜL (Üye)

MANİSA-2019

YAYGIN BEYİN HASARI SONRASINDA PİOGLİTAZON'UN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Öğrenci: Işıl Aydemir

Danışman: Prof. Dr. Kamil Vural

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet İbrahim Tuğlu

Bu tez çalışması 23.12.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kamil Vural

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Ad.

(imza)



Üye :

Prof. Dr. Ercüment Ölmez
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Ad.



Üye:

Prof. Dr. Başar Sırmagül
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Farmakoloji Ad.



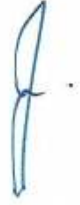
Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönelmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından başarılı bulunmuştur. **31...12...2019**

Prof. Dr. Ömer TEK
Enstitü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Işıl AYDEMİR

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için 2018-210 numaralı proje ile destek sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tezimin gerçekleşmesinde bana her zaman yol gösteren, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, eğitimim boyunca manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kamil Vural'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet İbrahim Tuğlu, Prof. Dr.ERCÜMENT ÖLMEZ ve Doç. Dr. Tuğba Çavuşoğlu hocalarıma,

Tezimin deneyleri sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Ertan Darıverenli ve Uzm. Bio. Fatih Çöllü'ye ve Farmakoloji Anabilimdalı asistan arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca maddi manevi her koşulda beni destekleyen ve benimle birlikte lisanüstü eğitim yapan aileme sabrı ve fedakârlığı için müteşekkirim.

Işıl AYDEMİR

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ATP:	Adenozin trifosfat
Bad:	Bcl-2 associated death promoter
Bak:	Bcl-2 antagonist/killer 1
Bax:	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
BclXs:	Bcl-2 like 1
BH4:	Tetrahidrobiopterin
Bid:	BH3 interacting-domain death agonist
Bim:	Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death
BIR:	Baculovirus Apoptoz inhibitör protein tekrarı
BMP2:	Kemik morfogenetik protein 2
BrdU:	Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)
Ca²⁺:	Kalsiyum iyonu
CaM:	Kalmodulin
CAT:	Katalaz
CD:	Hücre farklılaşma kümeleri molekülü
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
cIAP1:	Hücre Apoptoz inhibitör proteini 1
CO₂:	Karbondioksit
cNOS:	Yapısal nitrik oksit sentaz
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDRF:	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
eNOS:	Endotelial nitrik oksit sentaz
iNOS:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IL-1β:	İnterlökin-1beta
IL-10:	İnterlökin-10
nNOS:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO:	Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz
Noxa: NADPH oksidaz aktivator 1
O2: Moleküler oksijen
ROS: Reaktif oksijen türevleri
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü



RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>		<u>Sayfa</u>
Resim 6.1.1.	Kafa travması sonrası 7. güne ait KONTROL grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Ok başları: Normal nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	38
Resim 6.1.2.	Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	39
Resim 6.1.3.	Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+SF grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	40
Resim 6.1.4.	Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+1mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	41
Resim 6.1.5.	Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+10mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	42
Resim 6.1.6.	Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+30mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	43
Resim 6.1.7.	Kafa travması sonrası 28. güne ait KONTROL grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Ok başları: Normal nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	44

Resim 6.1.8.	Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	45
Resim 6.1.9.	Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+SF grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	46
Resim 6.1.10.	Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+1mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	47
Resim 6.1.11.	Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+10mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	48
Resim 6.1.12.	Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+30mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).	49
Resim 6.2.1.1.	Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda eNOS dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	51
Resim 6.2.1.2.	Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda eNOS dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	52
Resim 6.2.2.1.	Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda iNOS dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	54
Resim 6.2.2.2.	Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda iNOS dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	55
Resim 6.2.3.1.	Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda NeuN	57

	dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	
Resim 6.2.3.2.	Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda NeuN dağılımı. Oklar: İmmunpozitif hücreler, Barlar: 100µm.	58
Resim 6.2.4.1.	Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda TUNEL boyama görüntüleri. Oklar: Apoptotik hücreler, Barlar: 100µm.	59
Resim 6.2.4.2.	Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda TUNEL boyama görüntüleri. Oklar: Apoptotik hücreler, Barlar: 100µm.	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 4.2.2.1.	NO kaynakları ve oluşumu	14
Şekil 4.3.2.1.	Apoptozin instrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik yolak mekanizmaları	22
Şekil 4.3.2.1.1.	Apoptozin instrinsik yol üzerinden düzenlenmesi	23
Şekil 4.3.2.2.1.	Apoptozin ekstrinsik yol ile düzenlenmesi	24



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 4.2.1.1.	Serbest radikallerin sınıflandırılması	10
Tablo 4.2.2.1.	NO sentezleyen enzimler	13
Tablo 5.4.1.	Parafin Takip Protokolü	31
Tablo 5.5.1.	Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	32
Tablo 5.6.1.	İndirekt İmmunohistokimya Boyama Protokolü	34
Tablo 5.7.1.	TUNEL Boyama Protokolü	35
Tablo 6.1.1.	Histopatolojik parametrelerin 7. gün gruplarında değerlendirilmesi.	38
Tablo 6.1.2.	Histopatolojik parametrelerin 28. gün gruplarında değerlendirilmesi.	44
Tablo 6.2.1.1.	Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde eNOS dağılımına etkisinin karşılaştırılması.	50
Tablo 6.2.2.1.	Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde iNOS dağılımına etkisinin karşılaştırılması.	53
Tablo 6.2.3.1.	Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde NeuN dağılımına etkisinin karşılaştırılması.	56
Tablo 6.2.4.1.	Deney sonrasında 7. gün gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.	59
Tablo 6.2.4.2.	Deney sonrasında 28. gün gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.	60

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ	iii
RESİMLER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. KAFA TRAVMASI	7
4.1.1. Epidemiyoloji	7
4.1.2. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması	8
4.1.3. Kafa Travmalarının Patofizyolojisi	8
4.1.3.1 Primer Hasarlar	8
4.1.3.2. Sekonder Hasarlar	8
4.2. OKSİDATİF STRES	9
4.2.1. Serbest Radikaller	9
4.2.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz	11
4.2.3. Oksidatif Stresin Etkileri	14
4.2.3.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu	15
4.2.3.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	15
4.2.3.3. Nükleik Asitlerin Oksidatif Modifikasyonu	16
4.2.3.4. Karbonhidratların Oksidatif Modifikasyonu	16
4.2.3.5. Oksidatif Stresin Sistemik Etkileri	16
4.3. APOPTOZ	17
4.3.1. Apoptoz Mekanizmasında Rol Oynayan Moleküller	18

4.3.1.1. Kaspazlar	18
4.3.1.2. Bcl-2 Ailesi	18
4.3.1.3. p53 Geni	19
4.3.1.4. FAS (APO-1 veya CD95)	19
4.3.1.5. c-myc Geni	19
4.3.1.6. Endonukleaz G	19
4.3.1.7. Apoptoz İndükleyici Faktör	20
4.3.1.8. Apoptoz İnhibitör Proteinleri	20
4.3.2. Apoptoz Mekanizması	20
4.3.2.1. İnstrinsik Yol	21
4.3.2.2. Ekstrinsik Yol	22
4.3.2.3. Granzim B/Perforin Yolağı	23
4.3.3. Apoptoz Morfolojisi	24
4.3.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	24
4.4. NÖRONAL NUKLEAR PROTEİN	26
4.5. PİOGLİTAZON	26
5. GEREÇ VE YÖNTEM	28
5.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	28
5.2. Kafa Travması Modelinin Oluşturulması	28
5.3. Grupların Oluşturulması ve PG Uygulanması	29
5.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Parafin Doku Takibi	29
5.5. Histokimyasal Boyama	30
5.6. İndirekt İmmunohistokimyasal Boyama	31
5.7. TUNEL Boyaması	33
5.8. İstatistik	35
6. BULGULAR	36
6.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	36
6.2. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI	48
6.2.1. eNOS	48
6.2.2. iNOS	50
6.2.3. NeuN	52
6.2.4. TUNEL	54
7. TARTIŞMA	57

8. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
9. KAYNAKLAR	62
10. EKLER	71
Ek 1. Yönetim Kurulu Kararı	71
Ek 2. Etik kurul onayı	72
Ek 3. Benzerlik Raporu	73
Ek 4. Özgeçmiş	74



Tezin Başlığı: Yaygın Beyin Hasarı Sonrasında Pioglitazon'un Nöroprotektif Etkisi

Öğrencinin Adı : Işıl AYDEMİR
Danışmanı : Prof. Dr. Kamil VURAL
İkinci Danışman : Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU
Anabilim Dalı : Farmakoloji

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, deneysel kafa travması modeli oluşturulan sıçanlara üç farklı dozda verilen Pioglitazon'un beyinde koruyucu (nöroprotektif) etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Deneyde erkek sıçanlarda ağırlık düşürme yöntemi ile travma oluşturuldu. Denekler; kontrol, travma, travma+serum fizyolojik su (SF), travma+1 mg/kg PG, travma+10 mg/kg PG ve travma+30 mg/kg PG olmak üzere altı gruba ayrıldı. İlk ilaç uygulaması kafa travmasından 30 dak önce yapıldı. PG, 100µl serum fizyolojik suda hazırlanarak 1mg/kg, 10mg/kg ve 30mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak 5 gün süreyle günde tek doz olarak verildi. İlaç uygulamaları sonrası 7. ve 28. günlerde genel anestezi altında hayvanlardan beyin örnekleri çıkarılarak histokimyasal olarak hematoksilen ve eozin ile, immunohistokimyasal olarak anti-eNOS, anti-iNOS ve anti-NeuN antikorları ile boyandı. Apoptozu belirlemek amacıyla ise TUNEL yöntemi kullanıldı. Tüm boyamalar ışık mikroskop altında incelenerek sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: Beyin dokusu örnekleri histolojik açıdan incelendiğinde, travma ve travma+SF gruplarında belirgin doku hasarının meydana geldiği, nöronlarda piknozis ve sitoplazmada vakuollerin varlığı görüldü. PG uygulaması sonrası, hasarın 28. gün örneklerinde 7. gün örneklerine göre belirgin şekilde azaldığı izlendi. Hem 7. gün hem de 28. gün gruplarında eNOS ve iNOS immunoreaktiviteleri ile apoptotik hücre sayısı, travma ve travma+SF gruplarında yüksek iken PG uygulamasıyla doz artışına bağlı olarak azaldığı görüldü. NeuN immunoreaktivitesinin ise kontrol gruplarında yüksek iken travma ve travma+SF gruplarında azaldığı, PG uygulanan gruplarda artmış olduğu izlendi. Yüksek dozdaki PG uygulamasının, diğer dozlara oranla daha etkin olduğu saptandı.

Sonuçlar: PG uygulamasının, kafa travması modelinde hayvanlarda doku hasarına karşı koruyuculuğu gösterildi. Bu nöroprotektif etkinin moleküller

mekanizmalarının araştırılması, tedavi etkinliğinin ve hasta yaşam kalitesinin artırılmasında yeni bir yaklaşım oluşmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kafa travması, pioglitazon, nöroprotektif etki, oksidatif stres, apoptoz.



Title: The Neuroprotective Effect of Pioglitazone on Common Brain Injury

Student Name : Işıl AYDEMİR

Supervisor : Prof. Dr. Kamil VURAL

Second Advisor: : Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Department : Pharmacology

2. ABSTRACT

Aim: In our study, we aimed to investigate the protective (neuroprotective) effect of Pioglitazone (PG) in three different doses to rats with experimental common brain injury.

Materials and Method: In the experiment, male rats were traumatized by weight throw method. Rats were divided into six groups; control, trauma, trauma+saline, trauma+1 mg/kg PG, trauma+10 mg/kg PG and, trauma+30 mg/kg PG. The first drug administration was performed 30 minutes before brain trauma. PG was prepared in 100µl saline and was given as a single dose daily for 5 days at doses of 1 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg intraperitoneally. On the 7th and 28th days after drug administration, brain samples were removed from the animals under general anesthesia and stained histochemically with hematoxylin and eosin, immunohistochemically with anti-eNOS, anti-iNOS and anti-NeuN antibodies. TUNEL method was used to determine apoptosis. All staining was examined under a light microscope and the results were analyzed statistically.

Results: Histological examination of brain tissues showed significant tissue damage in trauma and trauma+saline groups, picnosis in neurons and vacuoles in cytoplasm. After PG application, it was observed that the damage decreased significantly in 28th day samples compared to the 7th day samples. The immunoreactivities of eNOS and iNOS and also apoptotic cell count were high in both the 7th and 28th day groups, whereas it was decreased in PG groups due to the increase in dose. It was observed that NeuN immunoreactivity was high in control groups, while it decreased in trauma and trauma+SF groups, and increased in PG groups. The high dose (30 mg/kg) of PG was found to be more effective than other doses.

Conclusion: PG was shown to be protective against tissue damage in animals in the head trauma model. Investigation of the molecular mechanisms of this neuroprotective effect will lead to a new approach in improving treatment efficiency and patient quality of life.

Key Words: Brain injury, pioglitazone, neuroprotective effect, oxidative stress, apoptosis.



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kafa travması, gündelik hayatta kaza sonrası sık görülen bir olgudur. Özellikle erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan 2-3 kat daha fazladır ve sıklıkla 15-24 yaş arası kişilerde meydana gelmektedir. Kafa travmaları, ağırlığına göre, genel olarak hafif, orta ve ağır şeklinde sınıflandırılmaktadır. Geçici bilinç kaybı, bellek kaybı, belirgin bir nörolojik bulgunun olmaması gibi belirtiler hafif şiddetteki travmayı işaret etmektedir. Bu belirtiler geçici veya kısa dönemdeki bulguları içeren primer hasar olmakla birlikte uzun dönemde beyin dokusunda herhangi bir hasar da görülebilmektedir. Uzun dönemde sekonder hasar adı verilen ve iskemi, beyinde ödem, beyin kan akımında azalma, eksitotoksisite ve iyon homeostazında bozulma gibi patolojik olguları içeren bir tablo meydana gelebilmektedir (Ayhan ve ark. 2008). Bu noktada beyin dokusunda oluşabilecek patolojik durumu ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için ilaç uygulamasından cerrahi müdahaleye kadar birçok seçenek bulunmaktadır (Adams ve ark. 2018; Levin ve ark. 2015). Travma sonrası en önemli hasar iskemidir. Beyne giden kan akımının azalması ve hücrelerin yeterli oranda oksijenlenememesi sonucu serbest radikal birikiminin artması yani oksidatif stres ile karakterizedir. İskemi ve oksidatif stres, tipik hücrelölümler ile nöron sayısında azalma ile sonuçlanır (Goyal ve ark. 2018).

Travma sonrası tedavide en önemli hedef sinir sistemine ait organlarda hasarın ortadan kaldırılması veya en az hasarla yaşam fonksiyonlarının devamını sağlamaktır. Tedavisi için ilaç ile birlikte cerrahi işlem yapılabilmektedir. Ancak sinir dokusunun kendini tamir etmesi oldukça zor olmasından dolayı ölüm oranı yüksektir (Tauchi ve ark. 2018).

Pioglitazon, tiazolidinedionlar grubuna ait antidiyabetik etkiye sahip bir etkidir. Yapılan retrospektif çalışmalarda pioglitazonun diyabetli hastalarda demansı geciktirdiği saptanmıştır. Aynı zamanda deneysel hayvan modelleme çalışmalarında pioglitazonun sinir doku onarımında etkin olduğu gösterilmiştir (Katz ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda kafa travması modeli üzerinde pioglitazonun nöroprotektif etkisi henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmamızda deneysel kafa travması

sonrası pioglitazonun nöroprotektif etkisi olup olmadığı oksidatif stres ve apoptoz yönünden değerlendirilerek ortaya konulması amaçlandı.



4.GENEL BİLGİLER

4.1. KAFA TRAVMASI

4.1.1. Epidemiyoloji

Kafa travması, kontrolsüz bir şekilde mekanik kuvvete maruziyet sonucu oluşan intrakraniyal bir hasar olgusudur. Hasar mekanizması, kontüzyondan ölüme kadar olan geniş bir skalayı içermektedir. Travmaya neden olan faktörler arasında direkt maruz kalınan şiddetli darbe, ateşli silahla yaralanma veya şiddetli patlama yer almaktadır. Bu faktörlerin yönü, şiddeti ve süresi hasarın derecesini belirleyen etmenlerdir. Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde, erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre 2-3 kat daha fazladır (Kılıçarslan 2016).

Türkiye’de ise kafa travması vakalarına ilişkin insidans verilerini içeren bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun nedeni ise, veri kayıt sistemindeki aksaklıklar ve düzenlemelerin henüz tam uygulanmamasıdır.

Gelişmiş ülkelerde, yüksek gelir düzeyine sahip bireylerin motorlu araç kullanımı artmıştır; dolayısıyla meydana gelen trafik kazalarında meydana gelen kafa travması insidansı da artış göstermiştir. Özellikle Avrupa geneline bakıldığında, düşme ve trafik kazalarının neden olduğu kafa travması vakalarının oldukça artmış olduğu bildirilmektedir. İngiltere ve Galler’de, hastanelerdeki kafa travması vaka sayısının yılda 1.4 milyon olduğu saptanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki insidansın 100.000’de 85 olduğu bildirilmektedir (Kılıçarslan 2016).

4.1.2. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması

Kafa travmaları, morfolojisi, mekanizması ve şiddetine sınıflandırılmaktadır. Morfolojik olarak sınıflandırmada, travma sırasında veya sonrasında oluşan kafatası kırıkları ve kafa içi lezyonlarının patolojisi ele alınmaktadır (Kılıçarslan 2016).

Oluşum mekanizması açısından künt ve delici (penetran) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Penetran travmalarda, kafatası kemiğinin hemen altında yer alan dura mater ile birlikte bütünlüğünün kaybolması önemli bir faktördür. Künt travmalar ise,

kafatası kemiğinde kırık oluşmadan kafa içi lezyonların meydana gelmesiyle oluşmaktadır (Gergin 2015).

Gerçekleşme şiddetine göre ise kafa travmaları Glaskow Koma Skoru (GKS)'na göre sınıflandırılmaktadır. Bu skorlamaya göre travmalar hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç grupta incelenmektedir. GKS'ye göre skorun 8'den küçük olması ağır beyin hasarını karşılarken, orta düzey hasar 9-13, hafif şiddetteki hasar ise 14-15 olarak ifade edilir (Gergin 2015).

4.1.3. Kafa Travmalarının Patofizyolojisi

4.1.3.1. Primer hasarlar

Primer hasarlar, kafa travması sırasında veya hemen sonra beyinde oluşan hasarları kapsamaktadır. Mekanik kuvvetin şiddetine bağlı olarak, kafatası kemiğinde kırıklar, kırıkların veya yabancı cisimlerin beyin dokusuna penetrasyonu meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla, beyin substansiya alba tabakasındaki traktuslarda kopmalarla birlikte aksonal bozulmalar ve ölümle sonuçlanabilmektedir. Diğer yandan kafa içi lezyon şeklinde meydana gelebilen epidural, subdural ve subaraknoid kanama ve intraserebral kanamalar, beyin sapında hasar, kraniyal sinir hasarları ve hipotalamik yaralanmalar primer hasarlardır (Gergin 2015; Kılıçarslan 2016).

4.1.3.2. Sekonder hasarlar

Sekonder hasarlar, travmadan sonra uzun dönemde ortaya çıkan hasarlardır. Beyin dokusunda biyokimyasal mekanizmaların tetiklenmesi ile iskemi ve intrakraniyal hipertansiyon sonucu hücre ölümü ve dolayısıyla doku kaybı ile sonuçlanır (Gergin 2015; Kılıçarslan 2016).

Kafa travması sonrası hasarın ilk aşamasında direkt doku hasarı, kafa içi basınçta artış, serebral kan akımının azalması ve metabolizmasında aksamalar görülmektedir. Bunu ödem, anaerobik glikoliz ve hücre membran geçirgenliğinin artmasıyla laktik asit birikimi takip eder. Travmasının ileri aşamasında ise, glutamat ve aspartat gibi eksitator nörotransmitterlerin aşırı aktivasyonu ile kalsiyum ve sodyum kanallarından hücre içine kalsiyum ve sodyum girişi olur. Kalsiyumun hücre içi proteaz, fosfolipaz ve peroksidaz gibi enzimleri aktive etmesiyle hücre içindeki serbest radikallerin miktarında artış görülür, bu durum nekroza veya programlı hücre ölümü apoptoza neden olur (Gergin 2015; Kılıçarslan 2016).

Travma sonrası kafa içi basıncın artması, mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır. Erişkin bir insanda normal basınç değeri 0-20 mmHg arasındadır. Basıncın 20 mmHg ve üzerinde 5 dakikadan uzun süre devam etmesi sonucu serebral kan akımı ve BOS miktarı düşer. Sonuçta iskemi, serbest radikal birikimiyle oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stresin etkisiyle hücre ölümü tetiklenir (Gergin 2015).

4.2. OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması durumu oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Reaktif oksijen türleri, metabolik ve fizyolojik süreçler esnasında üretilir ve organizmada oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilir. Hücrelerdeki oksidasyon redüksiyon bozuklukları protein, lipid, DNA dahil olmak üzere hücrenin bütün bileşenlerine peroksidaz ve serbest radikal üretimi ile toksik etki eder. Ayrıca bazı reaktif oksijen metabolitleri oksidasyon redüksiyon olaylarında hücre içi haberci gibi hareket eder. Böylece oksidatif stres normal hücre içi sinyal iletiminde bozulmalara neden olabilir. İnsanda oksidatif stres kanser, Parkinson, Alzheimer, ateroskleroz, kalp hastalığı, miyokardial infarktüs, fragil x sendromu, orak hücreli anemi, liken planus, kronik yorgunluk sendromu gibi birçok sistemik duruma neden olabilir. Reaktif oksijen metabolitlerinin immun sistemde patojenlerin öldürülmesinde faydaları da vardır. Ancak, oksidatif stresin fazla olması, antioksidanların yetersiz seviyesi veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu hücre hasarı veya hücre ölümüne neden olur. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir (Altan ve ark. 2006; Ögüt ve Atay 2012).

4.2.1. Serbest Radikaller

Biyolojik sistemlerde eşleşmemiş elektron barındıran elektron alıcı moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine oksidanlar denir (Altan ve ark. 2006; Ögüt ve Atay 2012). Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşmaktadır:

a) Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık, kovalent bağların homolitik kırılmasına neden olmaktadır. Kırılma sırasında bağ yapısındaki

iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde paylaşılmamış olarak kalmakta ve radikal formu oluşmaktadır.

b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile dış elektron yörüngelerinde paylaşılmamış elektron kalması durumunda radikal formu oluşmaktadır.

c) Normal bir moleküle elektron transferi ile dış elektron yörüngelerinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa da radikal oluşumuna neden olabilir (Altan ve ark. 2006; Ögüt ve Atay 2012).

Tablo 4.2.1.1. Serbest radikallerin sınıflandırılması.

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksid (H_2O_2)
Hidroksil ($HO^{\cdot}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil ($ROO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Alkoksil ($RO^{\cdot}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Lipit hidroperoksid ($LOOH$)
Semikinon radikali ($HQ^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller ($R^{\cdot}$)	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksid radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Hipohalöz asit (HOX)

Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, peroksil radikali ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (**Tablo 4.2.1.1**). Reaktif oksijen radikalleri, normal hücre metabolizması sırasında meydana gelmektedir. Radikal oluşumu esnasında oksijen, elektron transport zincirinde direkt basamaklar halinde suya indirgenir ve her bir basamakta serbest oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır. Enflamatuvar reaksiyonda rol oynayan fagositler tarafından, iyonize radyasyon, ultraviyole ışığı, hava kirliliği, sigara dumanı, hiperoksi, fazla egzersiz ve iskemi nedeniyle de serbest radikaller meydana gelebilmektedir (Muratoğlu 2014).

Süperoksid anyon radikali, zayıf reaktif bir serbest radikal olup moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak meydana gelmektedir. Burada ksantin oksidaz ve bir grup flavoenzimler ile lipooksijenaz ve siklooksijenaz tarafından oluşturulmaktadır. Fagositik hücrelerin indirgenmiş

nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) bağımlı oksidaz enzim kompleksi fazla miktarda süperoksit radikali oluşturmaktadır. Süperoksit anyon radikali, süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmektedir (Muratoğlu 2014).

Oksidatif stresin nedenlerinden biri olabilen hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır. Oksitleyici özelliği, metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimelere neden olmaktadır. Hücrelerde katalaz enzimi tarafından su ve oksijene parçalanarak ortamdaki uzaklaştırılır (Aksin 2012).

Çok reaktif bir ajan olan hidroksil radikali, hücresel metabolizmada kullanılmakta, fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilmektedir. Hidroksil radikali en reaktif radikal olarak bilinmekte ve her moleküle saldırarak hasar meydana getirebilmektedir. DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşebilmektedir. Özellikle, araşidonik asitler gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden hidrojen atomunu çıkartmakta ve sonuçta su oluşumunu sağlamaktadır. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (Aksin 2012).

4.2.2. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik Oksit (NO), önceleri endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak bilinen ve eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür (Palmer ve ark. 1987; Burke ve ark. 2013). NO, molekül ağırlığı 30,006 gr/mol olup serbest radikal yapısındadır. Yarı ömrü 20-30 sn'dir. Lipofilik özelliğe sahip NO, yüksek konsantrasyonlarda oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözülebilir. Düşük konsantrasyonlarda ise ortamda oksijen varlığında stabilitesini koruyabilmektedir (Lowensein ve ark. 1994; Star 1993).

Reaktif nitrojen türlerinden biri olan NO, üzerinde yük taşınamaması ve eşleşmemiş elektron bulundurması özelliği onu önemli bir mesajcı yapar. Yüksüz olduğu için hücre membranından hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolayca geçer ve

eşlenmemiş bir elektrona sahip olması nedeniyle hızlı reaksiyona girer (Lowensein ve ark. 1994; Star 1993; Moncada ve Higgs 2002; Ebrahimzadeh ve ark. 2010).

NO, pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile sentezlenmekte ve L-arginin ile O₂ molekülleri, NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir. NO' in sentez reaksiyonu sırasında moleküler O₂' nin yanı sıra kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve Hem kullanılır. Bu kofaktörler arasında elektron transferleri gerçekleşir (MacMicking ve ark. 1997; Alderton ve ark. 2001).

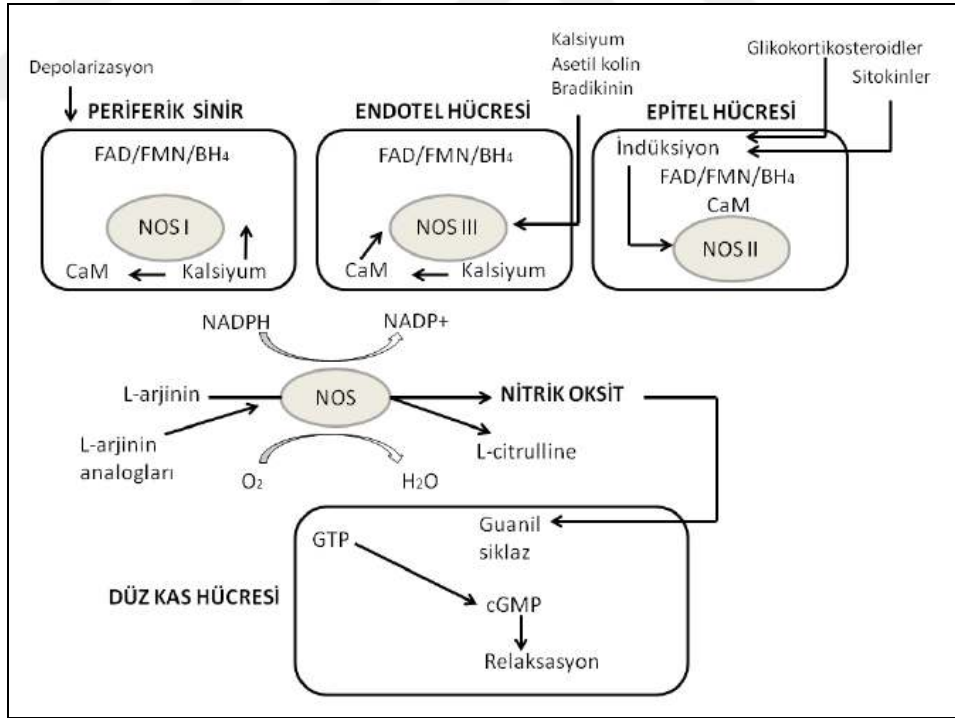
Tablo 4.2.2.1. NO sentezleyen enzimler.

NOS izoformu	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO miktarı
nNOS	Sürekli	Nöron	Kalsiyum	Düşük (picomol)
iNOS	Uyarılma ile	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, havayolu epiteli, immun hücreler, myokard		Yüksek (nanomol)
eNOS	Sürekli	Vasküler endotel hücresi, trombosit, nötrofil	Kalsiyum	Düşük (picomol)

L-Arjinin- NO yolu ile NOS enziminin çeşitli fonksiyonları tanımlanmış ve farklı hücrelerdeki türevleri bulunmuştur. NO, üç farklı NOS enzimi tarafından arjiniinden sentezlenir (Sugiura ve Ichinose 2011). Bunlar nNOS (nöronal, NOS 1), iNOS (indüklenabilir, NOS 2), eNOS (endotelyal, NOS3) (**Tablo 4.2.2.1**). Bu enzimler Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS) ve İndüklenabilir NOS (iNOS) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılırlar. Endotel (eNOS) ve nöron (nNOS) kaynaklı NOS, cNOS grubuna dahildir. Hücre içinde devamlı bir şekilde var olan ve kas kasılması ile nöronal iletim için aralıklı olarak ve küçük miktarlarda (picomol- nanomol) NO üreten bir enzimdir. Nöronal yapılar, endotel hücreleri, miyokard ve trombositlerde bulunur. Kofaktör olarak Ca²⁺/kalmodulin bağımlıdır. Ca²⁺'un yükselmesi kalmodulinin NOS' a bağlanmasını uyarır ve süratli bir şekilde pikomolar düzeylerde NO sentezlenir (Tejero ve Stuehr 2013).

Sentezi uyarılabilen iNOS ekspresyonu mikroçevredeki sitokin dengesine bağlıdır. Çeşitli uyaranlara (sitokinler, mikroorganizmalar, tümör hücreleri gibi) cevap olarak NO sentezi yapar. Bir kez eksprese edildiğinde yüksek miktarlarda ve daha uzun süre NO sentezleyebilir (Tejero ve Stuehr 2013). İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Ancak uzun süreli aşırı miktarda NO sentezi dokularda harabiyete yol açar. Enzim indüksiyonu L-arjinin analogları ve glukokortikoidlerce inhibe edilebilmektedir. Enzim, bilinen bu özelliklerinden dolayı indüklenebilir NOS veya kalsiyum bağımsız NOS olarak adlandırılmıştır (Hevel ve ark. 1991; Nussler ve Billiar 1993; Geller ve ark. 1993; Marletta 1994; Bachmann ve Mundel 1994; Dawson 1995; Leppänen ve ark. 2013).

NOS; NADPH, oksijen, flavoproteinler (FAD, FMN), kalmodulin ve tetrahidrobiopterinin (BH₄) varlığında L-arjinini, sitrullin ve NO'ya dönüştürür. NOS I (nNOS)- III (eNOS) nöronal ile endotel hücrelerinde yer alır ve enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyum artışına gereksinim duyar. NOS II kalsiyuma bağımlı değildir. Bütün NOS enzimleri arjinin analoglarınca inhibe (Şekil 4.9.2.1) edilir (Fidancı ve Gümüş 2011).



Şekil 4.2.2.1. NO kaynakları ve oluşumu (Özkan ve Yüksekol 2003).

Farklı NOS izozimleri tarafından sentezlenen NO, farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Lowenstein ve Snyder 1992). NO bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef

dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını artırır. Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit adezyon ve agregasyonunu azaltır (Michie ve ark. 1988; Moat ve ark. 1993). Mikroorganizmaların mitokondriyel proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar. Vazodilatasyona yol açarak lökosit migrasyonunu arttırır. Sonuçta antimikrobiyal ve fagositik aktiviteyi arttırarak inflamasyon gelişiminin sınırlanmasına katkıda bulunur (Campisi ve ark. 2002).

NO oluşuktan sonra; 1) Methemoglobin, nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşerek böylece inaktif olur; 2) Süperoksit anyonları (O_2^-) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO^-) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH^-) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH^- ve ONOO^- astım patogeneğinde rol alan moleküllerdir; 3) Guanilsiklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Özkan ve Yüksekol 2003).

4.2.3. Oksidatif Stresin Etkileri

Serbest radikaller, hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, moleküllerin yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Bu radikaller canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), nitrik oksit sentaz (NOS) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve alfa tokoferol gibi antioksidanlar tarafından yıkılarak ortamdaki uzaklaştırılır. Ancak serbest radikallerin aşırı üretimi ile meydana gelen oksidatif stresin diyabetes mellitus, iskemi reperfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma, kas hastalıkları gibi birçok hastalıklara yol açtığı bildirilmektedir (Shi ve ark. 2012; Keane ve ark. 2015; Liu ve ark. 2015).

4.2.3.1. Membranların lipid peroksidasyonu

Serbest oksijen radikalleri, hücre ve organel zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedirler. Hücre zarlarında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin yağ asitlerinden hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlamakta ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Hidroksil radikali, fosfolipaz A2'yi stimüle ederek araşidonik asit salınımına yol açmaktadır. Araşidonik asitten de bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatır. Başlangıçta serbest radikaller, bir lipid karbon merkezli radikalden üretilmiş olan karbon zincirinden, hidrojen atomunu açığa çıkarmaktadır. Sonuçta karbon merkezli radikal oluşmaktadır. Bu lipid radikal, moleküler oksijen ile reaksiyona girer, linoleik asit peroksiradikali oluşmasını sağlar ve oksidasyon zincirini başlatabilir. Üretilen peroksiradikal, elektronları ve diğer duyarlı yağ asitlerini alarak lipid radikal ve lipid hidroperoksitleri oluşturur. Bunun yanında süperoksit lipid peroksidasyonunu bitirici etki de gösterebilir. Membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, permeabilitede ve membran akışkanlığında değişikliklere yol açmaktadır. Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal Ca^{2+} girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol açabilmektedir (Aksin 2012).

Lipid peroksidasyonu tüm hücrelerde ve dokularda normalde düşük düzeylerde meydana gelir. Lipid peroksidasyonunu hipoksi, hiperoksi, bakır ve demir toksisitesi ve antioksidan yetersizlikleri stimüle eder. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Sinir lifleri etrafındaki miyelin kılıfı peroksidasyonu (demyelinizasyon) nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir. Akciğer sürfaktanının peroksidasyonu ise atelettazi ve pulmoner disfonksiyona (ARDS) yol açabilmektedir (Demircan 2013; Aksin 2012).

4.2.3.2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu

Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Serbest radikallerin etkisi ile bu moleküllerin sülfhidril gruplarında meydana gelen hasar sonucu protein moleküllerinin yapısı değişmekte ve oksidasyon reaksiyonları ile büyük agregatlar oluşmaktadır. Sülfür içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi halkalı amino asitleri içeren proteinler oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir (Muratoğlu 2014).

Serbest radikallerin protein molekülleri üzerindeki etkileri ile oluşan yapısal değişiklikler aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar şeklindedir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler, fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına neden olmaktadır (Aksin 2012; Muratoğlu 2014).

Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonlar bozulmaktadır. Oksidatif stres ile IgG ve albumin, yapısal modifikasyona uğrar. α -1 proteinaz inhibitörünün, oksijen radikalleri tarafından inhibisyonu ile amfizem gelişmektedir. Okside olmuş hemoglobinin süperoksit anyon radikali veya hidrojen peroksit ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olmaktadır (Aksin 2012; Muratoğlu 2014).

4.2.3.3. Nükleik asitlerin oksidatif modifikasyonu

Serbest radikallere duyarlı nükleik asitlerde oluşan geri dönüşümsüz hasarlar hücrelerin ölümüne sürüklenmesine neden olmaktadır. Hidroksil radikalleri, genetik materyali oluşturan bazlarla kolayca tepkimeye girerek baz modifikasyonları ve delesyonları ile zincir kırılmaları oluşturmaktadır. DNA’da, serbest radikallere en duyarlı baz timindir. Oksijen radikalleri ise oksidatif yarımla DNA hasarına yol açar. Dokularda oksidatif DNA hasarı belirteci 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG)’dir (Aksin 2012; Demircan 2013).

4.2.3.4. Karbonhidratların oksidatif modifikasyonu

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya geçen lökositlerden extrasellüler sıvıya salınan hidrojen peroksit ve süper oksid radikali, buradaki mukopolisakkarit olan hiyaluronik asidi parçalar. Gözde katarakt oluşumu sürecinde, vitröz sıvıda bol miktarda hiyaluronik asit bulunmasından dolayı oksidatif hasar etkili olmaktadır (Demircan 2013).

4.2.3.5. Oksidatif stresin sistemik etkileri

Çoğu hastalık, serbest radikaller ve bunların neden olduğu oksidatif stres ile ilişkilidir. Sinir sisteminde intraventriküler hemoraji, periventriküler lökomalazi ve travmatik beyin hasarı ile beyin tümörlerinin ortaya çıkmasında rol oynarken gözde

katarakt, retinopati ve makuler dejenerasyona neden olmaktadır. Gastrointestinal sistemde nekrotizan enterokolit ve Crohn hastalığına, solunum sisteminde ise astım, amfizem, respiratuvar distres sendromu ve kronik akciğer hastalığına; böbreklerde de glomerulonefrit ve renal yetmezliğe neden olmaktadır. Ayrıca serbest radikaller, hemoglobin ve otoimmün sistem hastalıkları, erken yaşlanma, kanser ve enflamatuvar hastalıkların oluşumundan sorumludurlar (Aksin 2012).

4.3. APOPTOZ

Fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, Yunanca'da apo (=ayrı) ve ptosis (=düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş, sonbaharda yaprak dokumu anlamına gelmektedir (Kerr ve ark. 1972; Debnath ve ark. 2005). Apoptoz ile ilgili ilk bilgiler, 1885'te Fleming tarafından ileri sürülen kromatoliz kavramı ile başlamış ve kromatoliz terimi sonraki yıllarda özellikle embriyologlar tarafından sıkça kullanılmıştır. Ancak 1950'li yılların sonlarında lizozomların ve 1960'lı yıllarda serbest radikallerin keşfedilmesi ile hücre intiharı kavramı kullanılmaya başlanmış ve 1970'li yıllarda da apoptoz ya da programlı hücre ölümü kavramı ortaya çıkmıştır. Apoptoz ile ilgili ilk çalışma 1972'de yapılmıştır (Kerr ve ark. 1972). Daha sonra 1984'de apoptozde görülen DNA kırıklarının jel elektroforezindeki karakteristik merdiven (ladder) kalıbı gösterilmiştir (Wyllie ve ark. 1984). Sonraki yıllarda apoptoz ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve apoptozin oluşmasında rol oynayan kaspaz aktivasyonu, apoptotik hücrelerin fagositozu ve mitokondriyel membran geçirgenliğindeki değişiklikler tarif edilmiştir. Apoptoz, patolojik hücre ölümü olan ve adenosin trifosfat (ATP) miktarının azalıp, hücre homeostazının hızla bozulduğu, enflamatuvar yanıtın geliştiği nekrozdan tamamen farklı olup; yangı olmaksızın hücrelerin kendilerini yok ettikleri, RNA ile protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan ve organizmada homeostazı koruyan, genlerle düzenlenen programlı bir olaydır (Hökelek 2009).

Apoptoz kaspazlar olarak adlandırılan bir grup sistein proteazların aktivasyonunu ve hücrelerdeki başlangıç uyarılarına bağlı kompleks ve koordine edilmiş kaskat olaylarını kapsayan, çoğunlukla enerji bağımlı bir süreçtir (Elmore 2007).

4.3.1. Apoptoz Mekanizmasında Rol Oynayan Moleküller

4.3.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağınyı kırarlar. Kaspaz (caspase) terimindeki “c” harfi bir aktif bölge sistein (cysteine)’i temsil ederken, “aspaz” (aspase) aspartik asit artıklarından hemen sonra bölübilme yeteneğini tanımlamaktadır. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirerek kaspaz kaskadını oluştururlar. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. Üç tipte kaspaz bulunmaktadır;

I- Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10.

II- Efektör kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7.

III- İnflamatuar kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14.

Başlangıçta inaktif durumdaki kaspazlar, proenzim formundadırlar. Aktif hale gelmeleri için bölünme bölgeleri diğer kaspazlar tarafından veya otokatalitik olarak hidrolize edilmelidir. Başlatıcı kaspaz bir kez aktive olduktan sonra diğer kaspazların hızlı ve sıralı aktivasyonu ile apoptozis başlatılır. Efektör kaspazlar hücre iskeleti ve nüklear matriks proteinlerini parçalayarak hücre iskeletinin bozulmasına ve nükleus yıkımına yol açarlar. Nükleus içerisinde kaspazlar; transkripsiyon, DNA replikasyonu ve DNA onarımında rol alan proteinleri parçalarlar. Bunlardan özellikle kaspaz-3 karakteristik internükleozomal DNA bölünmesine yol açan sitoplazmik bir DNAAz enzimini aktive eder (İnci ve ark. 2009).

4.3.1.2. Bcl-2 ailesi

Bir hücrenin apoptoze eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer veya homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi, proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere birbirine zıt iki gruptan oluşur. Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasında denge mevcuttur; hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoze eğilimi artar iken antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Proapoptotik üyeler sitosolde bulunan Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa’dır. Sitokrom-c ve Apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozi indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1’dir. Bu proteinler por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca^{2+} oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların

öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını inhibe ederek hücrenin apoptoze yönelmesini önlerler (İnci ve ark. 2009; Lalaoui ve ark. 2015).

4.3.1.3. p53 Geni

Tümör baskılayıcı gen olan p53, hücre siklusunda görev alan bir faktördür. DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup DNA tamir mekanizmasının devreye girmesini sağlar. DNA hasarı tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas üretimini artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılayarak apoptozin başlatılmasını indükler (İnci ve ark. 2009).

4.3.1.4. FAS (APO-1 veya CD95)

Fas reseptörü, 24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesinden biridir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve NK (natural killer) hücreleri üzerinde bulunur. 43 kDa molekül ağırlığındaki Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD (Fas-Associated protein with Death domain) molekülü ile birleşir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (Coşkun ve Özgür 2011).

4.3.1.5. c-myc Geni

Bir protoonkogen protein olan c-myc, hücreyi p53 ve Bax artışında apoptoze, Bcl-2 artışında mitozaya götürür. Bu genler iki yönde hücreyi yönlendiren bir denge sistemi oluştururlar. Bu aileye ait c-myc proteini hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir fosfoproteindir. c-myc'in gen amplifikasyonu ise hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve p53'e bağlı yoldan hücrenin apoptoze gönderilmesinde rol oynar. c-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır (Gabay ve ark. 2014).

4.3.1.6. Endonukleaz G

Endonukleaz G (Endo-G), mitokondrilerde bulunur ve kuvvetli nukleaz aktivitesine sahiptir. Mitokondride transkripsiyon sırasında RNA-DNA hibritlerinin

ayrılmasında görev yapar. Apoptotik uyarılar sonucu mitokondriden ayrılan endonükleaz G nükleusa geçerek burada DNA'nın parçacıklara ayrılmasını sağlar ve sonuçta hücre ölüme gider (Kaya ve ark. 2012).

4.3.1.7. Apoptoz indükleyici faktör

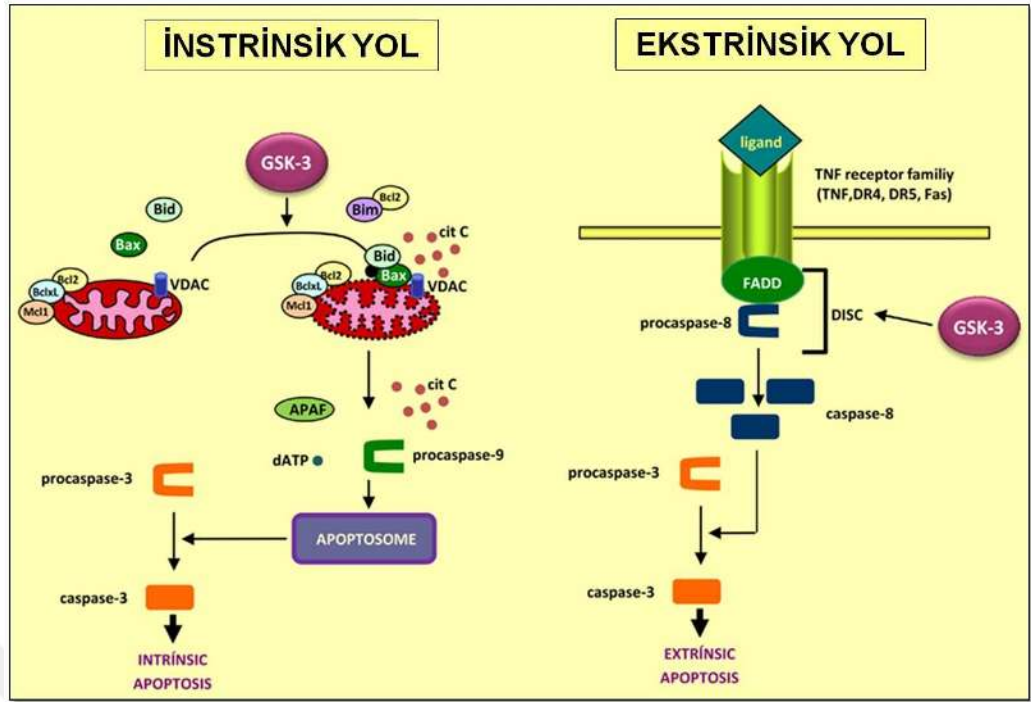
Proapoptotik proteinlerden apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ile birlikte mitokondriden salınır. Apoptotik uyarı sonucu mitokondriden ayrılarak nükleusa geçer. Nükleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın 50-300 kb'lar halinde parçacıklara ayrılmasına neden olarak apoptozte görev yapar (Elmore 2007).

4.3.1.8. Apoptoz inhibitör proteinleri

Apoptoz inhibitör proteinleri (IAP; inhibitor of apoptosis proteins), kaspaz aktivitesini prokaspaz veya kaspazlara bağlanarak inhibe ederler. IAP'leri sekiz adettir; bunlar nöronal IAP (NIAP), hücrel IAP1 (cIAP1), X-kromozomuna bağlı IAP (XIAP), survivin, baculovirus IAP tekrarı (BIR) içeren Ubikuitin konjuge enzim (BRUCE/Apollon), melanoma IAP (ML-IAP) ve IAP-benzeri protein 2 (ILP-2). Apoptoz esnasında mitokondrinin sitoplazmaya saldırdığı bir protein, IAP'leri baskılar. Kaspazları selektif olarak inhibe ederek apoptotik mekanizmayı durdururlar (Fulda 2013).

4.3.2. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz iki yolla gerçekleşmektedir: İntrinsik (Mitokondriyal) yol ve Ekstrinsik yol. Bu iki yolak dışında granzim B/perforin yolu da apoptoz ile ilişkilidir. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir (Elmore 2007). Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır (Şekil 4.3.2.1) (Contassot ve ark. 2007; Cotran ve ark. 2009).



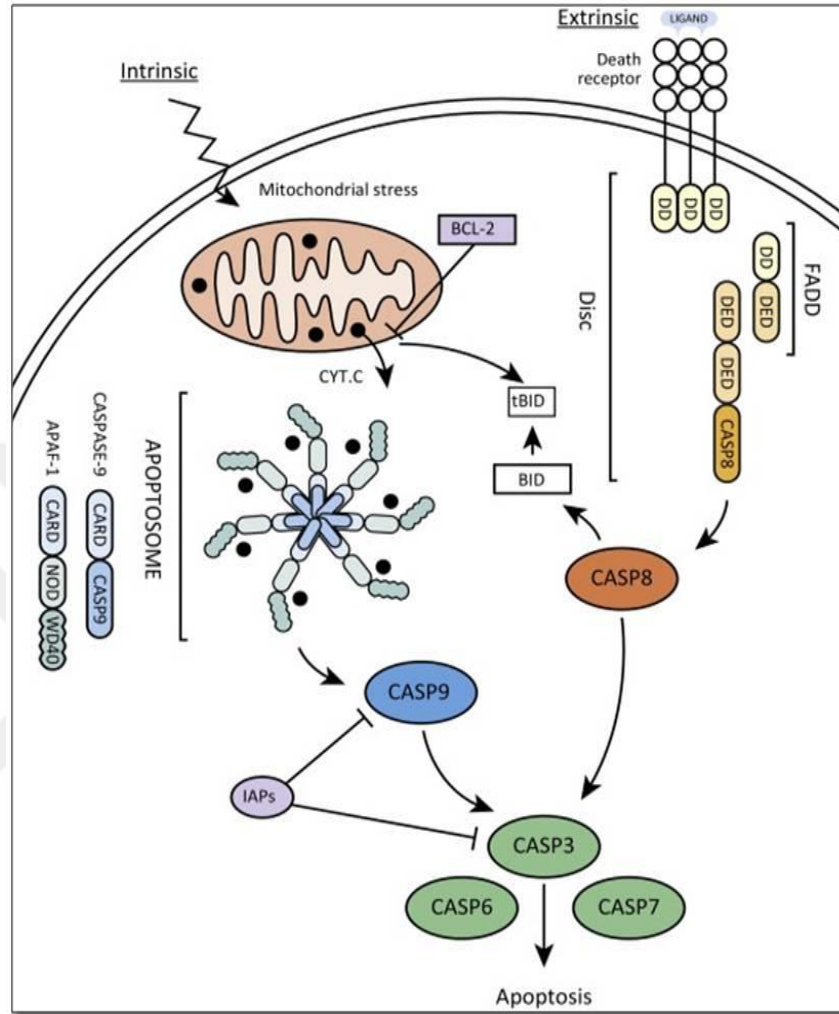
Şekil 4.3.2.1. Apoptozun intrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik yolak mekanizmaları.

4.3.2.1. İntrinsik yol

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Böylelikle mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G, Ca^{2+} ve AIF salınımını uyarır. Sitokrom-c, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. AIF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. Endo-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur (Chen ve ark. 2001; Chowdhury ve ark. 2008).

Apoptozom, kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir (Şekil 4.3.2.1.1).

CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Chen ve ark. 2001; Cotran ve ark. 2009).

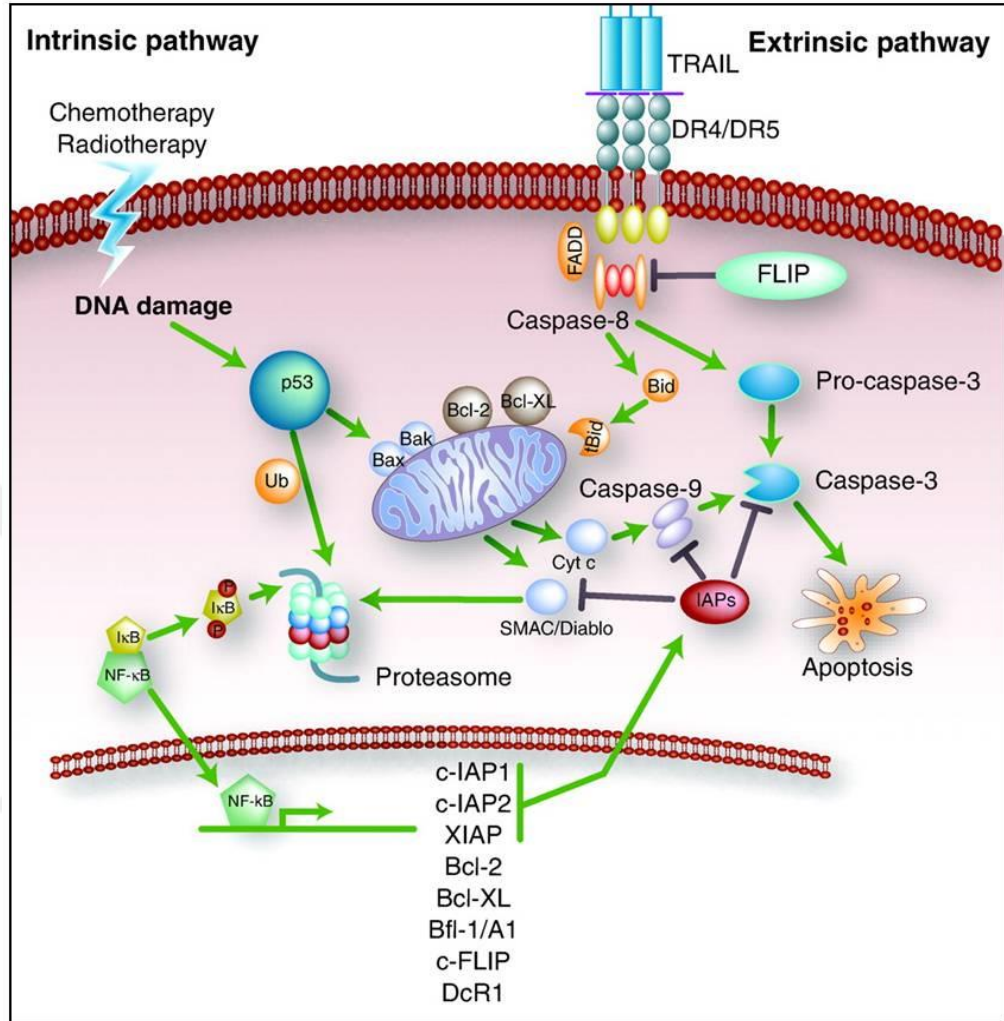


Şekil 4.3.2.1.1. Apoptozun instrinsik yol üzerinden düzenlenmesi.

4.3.2.2. Ekstrinsik Yol

Bu yolda ölüm reseptörleri rol alırlar. Ölüm reseptörleri, TNF ailesinden olan reseptörlerdir. Bunlardan Tip 1 TNF reseptörü ve Fas (CD95) olarak bilinen protein en önemlilerindendir. Bunlarda protein-protein etkileşmelerine katılan sitoplazmik ölüm bölgeleri bulunur ve dış ligandlarla çapraz bağlanma sonucu multimerize olurlar. Bu durum, çok sayıda inaktif kaspaz-8 moleküllerini birbirine yaklaştıran adaptör proteinler için bağlanma yerlerinin oluşmasına yol açar. Oluşan ön kaspazların düşük düzeydeki enzimatik aktivasyonu, sonuçta toplanan gruptan bir

proteinin bölünmesine ve aktivasyonuna neden olur ve böylece kaspazlar tetiklenir (Şekil 4.3.2.2.1) (Contassot ve ark. 2007).



Şekil 4.3.2.2.1. Apoptozin ekstrinsik yol ile düzenlenmesi.

4.3.2.3. Granzim B/Perforin yolağı

Perforinler ve granzimler, sitotoksik T lenfositler ve NK hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içerisinde bulunan proteinlerdir. Sitotoksik T lenfositler, hedef hücreye bağlandığında perforinler salgılanır ve salgılanan perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru, hücre içine kalsiyum girişinde hızlı bir artışa sebep olur. Granzim B, reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer. Hücre içine giren perforin proteini, vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Bu andan itibaren granzim B hızlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptoz ile birlikte prokaspaz

aktivasyonunu başlatır. Bununla birlikte granzim A da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozda rol alır. Granzim A özellikle tümör hücrelerinde kaspaz bağımsız bir mekanizma ile programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde rol alır. Bu salgısal apoptotik yol, patojenle infekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir (Yıldırım ve ark. 2012; Akşit 2007).

4.3.3. Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Apoptoz uyarısı alan hücre, komşu hücrelerle ve hücrelerarası madde ile bağlantısını kopararak bulunduğu ortamdan uzaklaşır ve büzülür. Çekirdek içerisinde kromatin yoğunlaşır, piknotik bir görünüm alır. DNA'sı nukleozomlarından endonukleazlar ile kesilir; bu nedenle jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü şeklinde izlenir. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfatidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzünde yerleşim gösterir; fosfatidil serin molekülünün hücre zarının dış yüzeyinde bulunması, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından bu hücrelerin tanınmasında ve apoptotik cisimciklerin fagositozunun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynar. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak enflamasyon görülmez (Yıldırım ve ark. 2012; Akşit 2007).

4.3.4. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozu saptamak için başlangıçta morfolojik kriterlere göre yöntemler kullanılmıştır. DNA kırıklarının oluştuğunun 80'li yılların sonuna doğru ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemler belirlenmiştir; 90'lı yılların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptoz, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir. Apoptozin belirlenmesinde kullanılan yöntemler; morfolojik görüntüleme yöntemleri,

immunohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immunolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleridir (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

Morfolojik görüntüleme yönteminde ışık mikroskop, floresan mikroskop, elektron ve faz kontrast mikroskoplardan faydalanılır. Bu yöntemde apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler, vb.) göz önünde bulundurularak apoptoz saptanmaya çalışılır (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptoz immunohistokimyasal yöntemlerle uygun belirtçeler kullanılarak belirlenebilir. Örneğin Anneksin V metodunda, apoptotik hücrelerin membran dış yüzeyinde yerleşim gösteren fosfotidilserine floresan işaretli Anneksin V' nin bağlanması ile apoptoz saptanır. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yönteminde DNA kırıkları in situ olarak tanınırken, apoptoze giden hücrelerde yolakta rol oynayan kaspazların (kaspaz-3 gibi) sentezlenmesinin belirlenmesinde immunohistokimyasal boyama yapılır (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

Biyokimyasal olarak da agaroz jel elektroforezi, Western blotting ve akım sitometrisi metodlarından yararlanılır. Apoptozte DNA 180 baz çifti ve bunun katları şeklinde kırılmalar gösterdiğinden, agaroz jel elektroforezinde tipik merdiven görüntüsü verir. Western blotting metodunda apoptoze özgü proteinlerin sentezlenip sentezlenmediğine göre saptama yapılırken, akım sitometrisinde ise apoptozte sentezlendiği bilinen hücre yüzey proteininin uygun antikor kullanılarak apoptoz belirlenir (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ile apoptotik süreç sonunda parçalanmış ve sitoplâzmaya sızmış mono ya da oligonükleozomları saptamak amaçlanır. Fluorometrik ölçümde ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

Moleküler düzeyde apoptoz belirlenmesinde DNA mikroarray analizi, yüzeye tutturulan DNA parçacıkları prob olarak kullanılarak apoptozda görev alan proteinlerin (ölüm reseptörleri, kaspazlar) gen ekspresyon dereceleri (mRNA) karşılaştırılır (Akşit 2007; Coşkun ve Özgür 2011).

4.4. NÖRONAL NUKLEAR PROTEİN

Nöronal nuklear protein (NeuN), 1992 yılında bulunan ve merkezi sinir sistemine ait organlarda nörona özgü bir belirteçdir. NeuN'un nörondaki fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte postmitotik nöronda nukleus ve perinuklear sitoplazmada yerleşim gösterdiği görülmüştür. 46 ve 48 kDa'luk iki adet izoformu bulunmaktadır. 46 kDa'luk izoformu daha çok nukleus içerisinde yerleşim gösterirken, 48 kDa'luk izoformunun perinuklear sitoplazmada yer aldığı bildirilmektedir. Bu iki izoform arasındaki lokalizasyon farkının kısa bir amino asit sekansından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sinir sisteminde çoğu nöronda bulunmaktadır, ancak Cajal-Retzius hücrelerinde, Purkinje hücresinde, retinanın iç nuklear tabakasını oluşturan nöronlarda, medulla spinalisteki γ -motor nöronlarda saptanmamıştır. Bu özelliğinden dolayı, çalışmalarda NeuN'un nöronal farklılaşma belirteci olarak kullanıldığı karşımıza çıkmaktadır (Mullen ve ark., 1992; Gusel'nikova ve Korzhevskiy 2015).

Sinir sistemi araştırmalarında NeuN diğer belirteçlerden daha kesin ve spesifik sonuçlar vermektedir. Bunun nedeni ise, bu proteinin sadece sinir dokusunda sentezleniyor olmasıdır. Diğer β -tubulin III, nörofilaman proteinleri, nöron spesifik enolaz ve nörol hücre adezyon molekülü gibi moleküller sinir dokusunun yanında diğer dokulara (kas ve epitel dokusu gibi) ait hücrelerde de bulunmaktadır (Gusel'nikova ve Korzhevskiy 2015; Petrova ve ark., 2014). Bu nedenle NeuN, nöronların spesifik olarak belirlenmesinde bir avantajdır.

4.5. PİOGLİTAZON

PG, tiazolidindionlar grubuna ait olup antidiyabetik etkiye sahiptir. Tiazolidindion grubu ajanlar, 1970'li yıllarda lipid azaltıcı ilaçların araştırılması esnasında bulunmuşlardır (Cariou ve ark. 2012). Bu grubun orijinal bileşiği ciglitazon olup, in vivo hayvan diabetes mellitus modelleme çalışmaları sonucunda hiperglisemi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi düzeylerinde düşüş sağlandığı tespit edilmiştir. 1980'li yıllarda ise glitazon içeren birden fazla ajan üretilmiştir. Glitazonların, antihiperglisemik etkileri ile birlikte lipid metabolizması, endotel fonksiyonu, oksidatif stres ve vasküler inflamasyon üzerinde olumlu etkileri mevcuttur. Bu dönemde ilk kullanılan ajan troglitazondur; ancak karaciğerde toksisiteye ve ölümlere neden olduğundan kullanımı yasaklanmıştır. 1999 yılında bu grup üyesi olan pioglitazon ve

rosiglitazon, tip 2 diyabet tedavisinde kullanımı için Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onay almışlardır (Cariou ve ark. 2012; Soccio ve ark. 2014; Yau ve ark. 2013).

PG, nükleer transkripsiyon faktörü PPAR- γ aktivatörü olup, trigliseridi düşürüp HDL kolesterolü artırır. Böylece pankreatik insülin salgılanmasında artışa neden olmadan insülin direncinin düşmesini sağlamaktadır. Vücutta pankreas Langerhans adacığındaki beta hücrelerinin metabolik aktivitesinin artması bu hücreleri programlı hücre ölümü apoptoza sürükleyebilmektedir. Tiazolidindionlar grubu ajanların, insülin direncinde azalmaya neden olduklarından dolayı tip 2 diyabetli hastalarda beta hücre kaybının önlendiği bildirilmektedir. Bu etkinin de oksidatif stresi azaltarak gösterdiği saptanmıştır. PG'nin, Tip 2 diyabet tedavisinde, açlık ve tokluk glisemi seviyesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Ancak, antidiyabetik etkisi yanında, organizmada su tutulumunu arttırdığından kalp yetmezliği gibi sağlık problemlerine sebep olabilmektedir. Ancak yapılan retrospektif çalışmalarda, kardiyovasküler hastalıklara ve tip 2 diyabete sahip hastalarda, PG kullanımı ile mortalite ve miyokard infarktüs sıklığında %18 oranında azalma tespit edilmiştir (Perdigoto ve ark. 2017).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12/09/2017 tarih ve 77.637.435 karar numaralı onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanı alımı ve bakımı, histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme için gerekli sarf malzemeler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-210 numaralı proje ile desteklenmiştir.

5.1. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BAKIMI

Deney için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 250 ± 50 gr arasında değişen 8 haftalık erişkin 60 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Temin edilen hayvanların daha önce çiftleşmemiş ve herhangi bir deneysel çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edildi. Bakımları ve deneysel uygulamalar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Sıçanlar, laboratuvar koşullarına adaptasyon amacıyla 22°C sıcaklık sağlanan ortamda, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu uygulanarak barındırıldı. Beslenmeleri sıçan yemi ve musluk suyu (*ad libitum*) ile yapıldı. Ayrıca 2 haftalık bir süreçte sıçanların ele alıştırma (handling) yöntemi ile deney yapan kişiye alışmaları sağlandı. Deneysel uygulamalar, deney hayvanlarının bulunduğu ortamdan uzak ve sessiz bir çalışma ortamında yapıldı ve uygulamalar sırasında sert ve ani hareketlerden kaçınılarak stres yaratılmamaya çalışıldı.

5.2. KAFA TRAVMASI MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Travma modeli için sıçanlar genel anestezi altında (10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin), yüz üstü yatırıldı ve orta hatta bregma ve lambdoid dikiş görülecek şekilde bir cilt insizyonu yapıldı. Periost, dikiş önde ve arkada tümü ile ortaya

konacak şekilde yanlara doğru itilerek orta hatta koronal ve lambdoid dikiş arasına 10 mm çapında 2 mm kalınlığında çelik disk konuldu. Daha sonra sıçanlar 12x12x43 cm boyutlarındaki sünger bir zemin üzerine yüzüstü yerleştirildi. İç çapı 20 mm, dış çapı 25 mm olan bir tüpün içinden 300 g ağırlığındaki çelik çubuk 1 metre yükseklikten bırakılarak serbest düşüş yapacak şekilde düşürülerek deneğin kafasına çarpması sağlandı. Açılan cilt kesileri 2/0 ipek ile dikilerek kapatıldı (Ucar ve ark. 2006).

5.3. GRUPLARIN OLUŞTURULMASI VE PG UYGULANMASI

Hayvanlar gruplara ayrılarak sham grubuna serum fizyolojik su, Pioglitazon (PG) ilacı 1 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak 24 saat arayla 5 gün boyunca verildi. İlk ilaç uygulaması kafa travmasından 30 dak önce yapılacaktır. Kontrol grubuna ise hiçbir işlem yapılmadı.

Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu;

Grup 1: Kontrol grubu, hiçbir uygulama yapılmadı, n:10.

Grup 2: Sadece kafa travma grubu, kafa travması oluşturuldu ve ilaç verilmedi, n:10.

Grup 3: Sham grubu, kafa travması sonrasında 100µl serum fizyolojik intraperitoneal olarak 24 saat arayla 5 gün süreyle verildi, n:10.

Grup 4: Kafa travması sonrasında 1 mg/kg dozunda PG 100µl içerisinde intraperitoneal olarak 24 saat arayla 5 gün süreyle verildi, n:10.

Grup 5: Kafa travması sonrasında 10 mg/kg dozunda PG 100µl içerisinde intraperitoneal olarak 24 saat arayla 5 gün süreyle verildi, n:10.

Grup 6: Kafa travması sonrasında 30 mg/kg dozunda PG 100µl içerisinde intraperitoneal olarak 24 saat arayla 5 gün süreyle verildi, n:10.

5.4. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE PARAFİN DOKU TAKİBİ

Sıçanlar, kafa travma modelinin oluşturulmasından sonraki 7 ve 28. günlerde, genel anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Beyinleri alınarak, histokimyasal, immünohistokimyasal ve TUNEL boyamaları için %10'luk formalin solüsyonu ile 48 saat tespit edildi. %10 formalinde tespit edilen örnekler, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra,

dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60'dan %100'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dk 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60°C'lik etüv içersinde 15 dk 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 60'ar dakika iki değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine (**Tablo 5.4.1**) gömüldü (Aydemir ve ark. 2018).

Tablo 5.4.1. Parafin Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A. TESPİT	%10 FORMALİN	48 SAAT
B. TESPİT SOLUSYONUNUN UZAKLAŞTIRILMASI	AKARSU	1 GECE
B. DEHİDRATASYON	%50 ALKOL	½ SAAT
	%60 ALKOL	½ SAAT
	%70 ALKOL	½ SAAT
	%80 ALKOL	½ SAAT
	%90 ALKOL	1 SAAT
	%95 ALKOL	1 SAAT
	%100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL: KSİLEN (1:1)	½ SAAT
	KSİLEN	1 SAAT
	KSİLEN	1 SAAT
D. İNFİLTASYON (60°C ETÜVDE)	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½ SAAT
	PARAFİN	1 SAAT
	PARAFİN	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

5.5. HİSTOKİMYASAL BOYAMA

Parafin bloklardan 5 µm'lik parafin kesitler Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alındı. Alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi

tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dk akarsu altında yıkandı. Kesitler 2 dk Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkandı ve kesitler 30 saniye Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler, şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilenle tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (**Tablo 5.5.1**). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) görüntüleri alındı ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (Aydemir ve ark. 2018).

Tablo 5.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	%80 ALKOL	1 DAKİKA
	%95 ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

5.6. İNDİREKT İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi

gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dk bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan ve %0,5'lik tripsin (800.729.8350, ScyTek, Utah, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dk tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS, sc-654, Santa Cruz Biotechnology) anti-indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS, GTX15322, Gene Tex) ve anti-nöronal nükleer protein (NeuN, ab104225, Abcam) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043, Invitrogen® -Histostain Plus Bulk Kit, CA, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoxilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumunu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı (**Tablo 5.6.1**). Kamera ataçmanlı (SC50, Olympus, Germany) ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) görüntüleri alındı. İmmunohistokimyasal pozitivite H-skor ile hesaplanarak gruplar arasındaki farklılık One-Way ANOVA testi ile değerlendirildi (Aydemir ve ark. 2018).

Tablo 5.6.1. İndirekt İmmunohistokimya Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA

Tablo 5.6.1. İndirekt İmmunohistokimya Boyama Protokolü(devamı)

YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
PBS	PBS	10 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C etüvde	15 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOKLAMA	Non-immun bloklama solüsyonu	1 SAAT
PRİMERANTİKORLAR		18 SAAT+4°C nemli
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIYOTİNLE İŞARETLİ	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	IŞIK MİKROSKOBU	

5.7. TUNEL BOYAMASI

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde **Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling** (TUNEL, S7101, Millipore, USA) boyama yöntemi kullanıldı. Alınan 5 µm'lik kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Yıkandıktan sonra PBS ile 1/500 oranında dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz-K 37°C'de 15 dk uygulandı. 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dk %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'şer dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dk Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C de 1 saat plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dk bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dk muamele edilen örnekler 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB

(Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı (**Tablo 5.7.1**). Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanıp sonuçlar apoptotik indeks olarak verildi. Apoptotik indeks için, doku kesitlerinin fotoğrafları çekildi ve 10 farklı alanda toplam hücre miktarı ve TUNEL pozitif hücreler sayılarak formüle göre indeks hesaplandı: Apoptotik indeks=(apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısı) x 100 (Aydemir ve ark. 2018).

Tablo 5.7.1. TUNEL Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60 °C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	PBS	10 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	PROTEİNAZ-K (37°C etüvde)	1 SAAT
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
EQUILIBRATION BUFFER		10 SANİYE
ENZİM	Tdt ENZİMİ (37°C etüvde)	1 SAAT
STOP WASH BUFFER		10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×1 DAKİKA
ANTI-DİOKSİGENİN	PEROKSİDAZ KONJUGATI	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidin)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

5.8. İSTATİSTİK

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11- 50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile boyanma şiddeti de 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Daha sonra “(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı” formülü ile toplam skor hesaplandı. Elde edilen veriler One Way-ANOVA istatistik testiyle karşılaştırıldı ve $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Aydemir ve ark. 2018).

6. BULGULAR

6.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

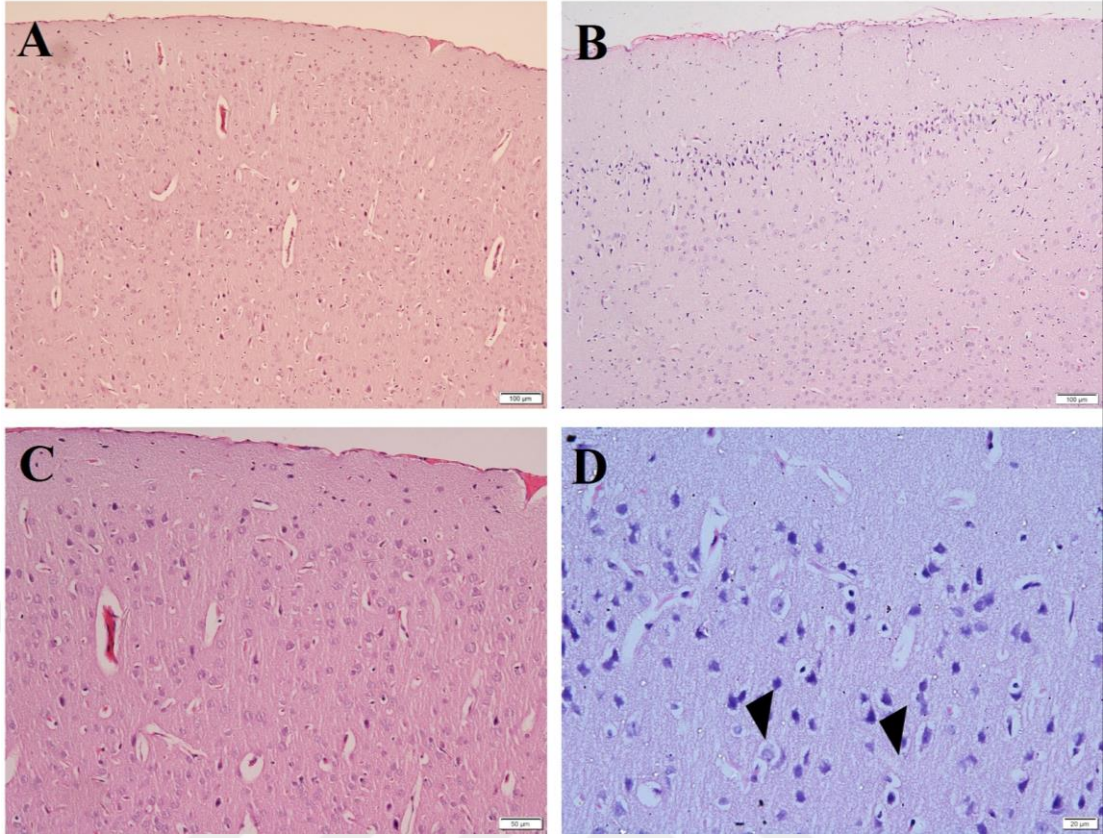
Genel histolojik yapıyı incelemek amacıyla hematoksilen ve eozin boyaması yapıldı. Histopatolojik değerlendirmede konjesyon, ödem, inflamasyon, nekroz ve kırmızı nöron varlığı parametreleri kullanıldı. Bu parametrelere ait skorlama 0-5 arasında yapıldı: 0 (hasar yok), 1 (minimal), 2 (hafif), 3 (orta), 4 (çok) ve 5 (şiddetli).

7. güne ait gruptaki örnekler incelendiğinde kontrol grubunda korteks ve medulla sınırlarının ayırt edilebildiği izlendi. Sınırları kesin olmamakla birlikte korteksi oluşturan altı adet katmanın var olduğu görüldü. Pia materin hemen altından başlamak üzere sırasıyla lamina molecularis, lamina granularis externa, lamina pyramidalis externa, lamina granularis interna, lamina pyramidalis interna ve lamina multiformis katmanları yer almaktadır. Katmanlarda bulunan hücrelerde sitolojik bir hasar saptanmadı (**Resim 6.1.1**).

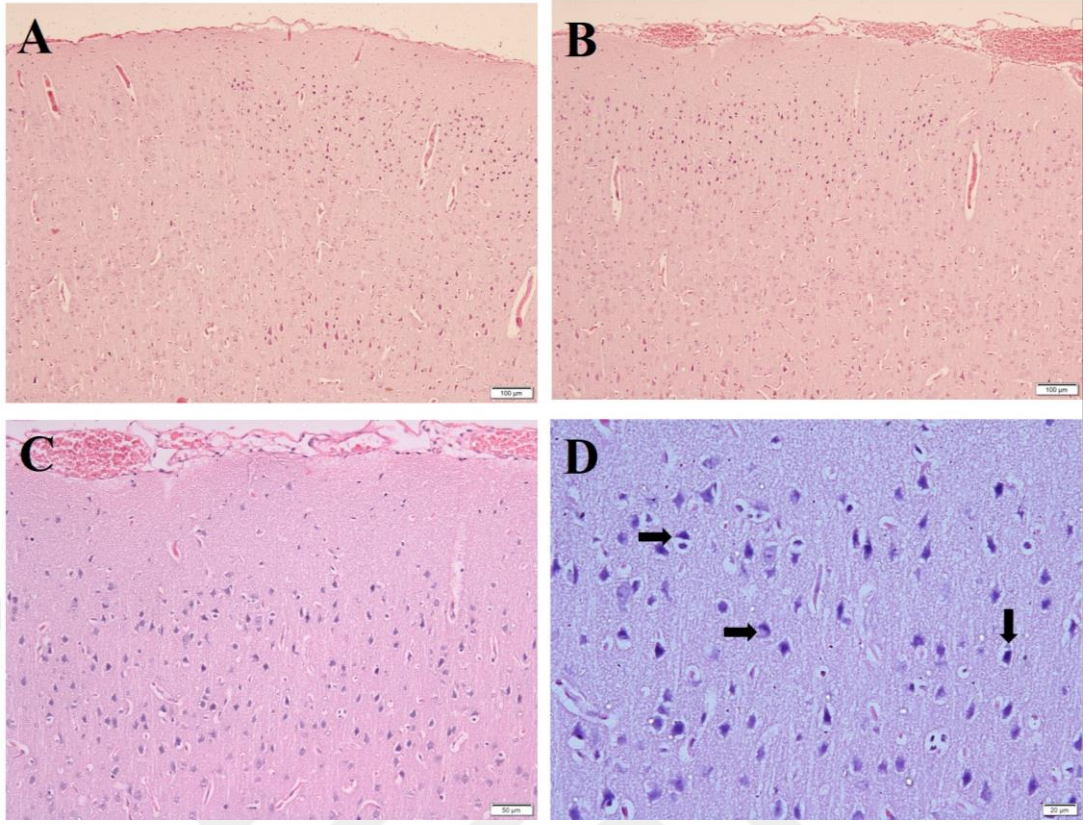
Travma ve travma+SF grubu örneklerinde ise, belirgin doku hasarı ile birlikte nöronlarda piknozis ve sitoplazmik vakuollerde artış belirlendi (**P<0.01). Ayrıca konjesyon, ödem, nekroz ve kırmızı nöron sayısı parametrelerinde kontrol grubuna göre artış görüldü (**Tablo 6.1.1**) (**Resim 6.1.2** ve **Resim 6.1.3**).

Tablo 6.1.1. Histopatolojik parametrelerin 7. gün gruplarında değerlendirilmesi.

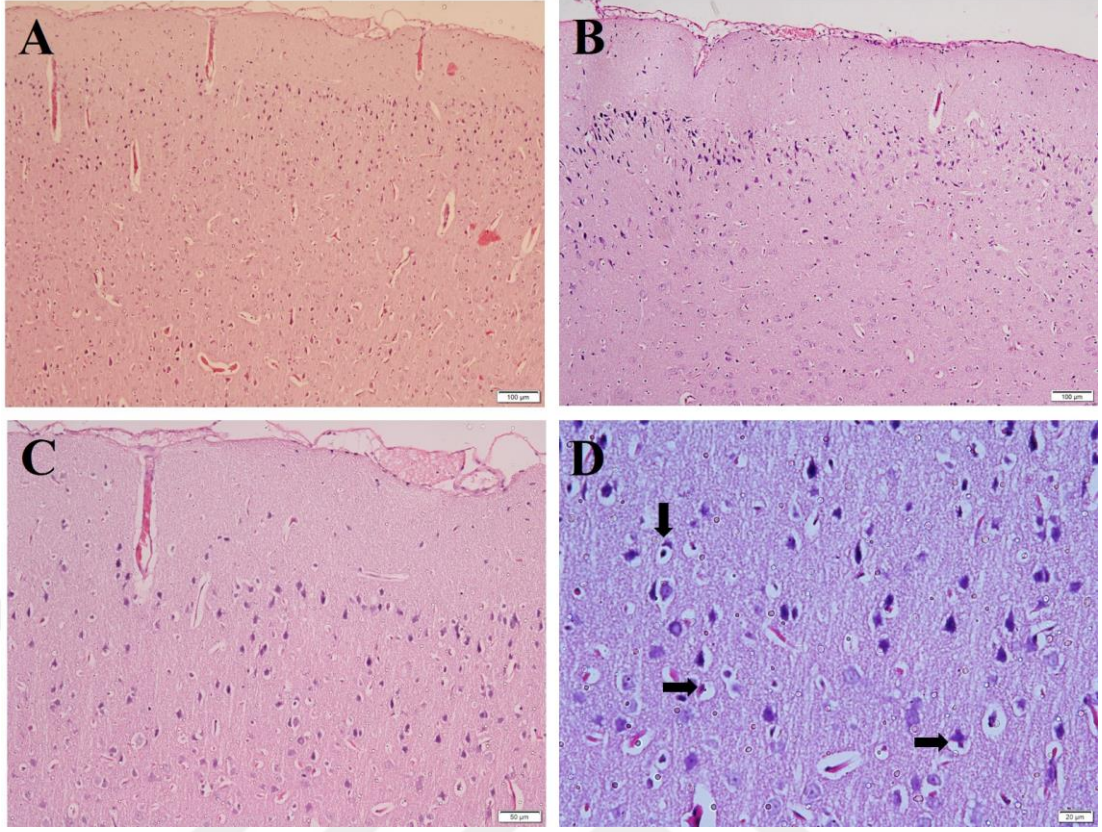
Gruplar Parametreler	Konjesyon	Ödem	Inflamasyon	Nekroz	Kırmızı nöron sayısı
KONTROL	0	0	0	0	0
TRV	4	4	3	3	5
TRV+SF	3	4	3	3	4
TRV+1mg/kg PG	3	3	2	2	3
TRV+10mg/kg PG	2	2	1	1	2
TRV+30mg/kg PG	1	1	1	1	1



Resim 6.1.1. Kafa travması sonrası 7. güne ait KONTROL grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Ok başları: Normal nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).

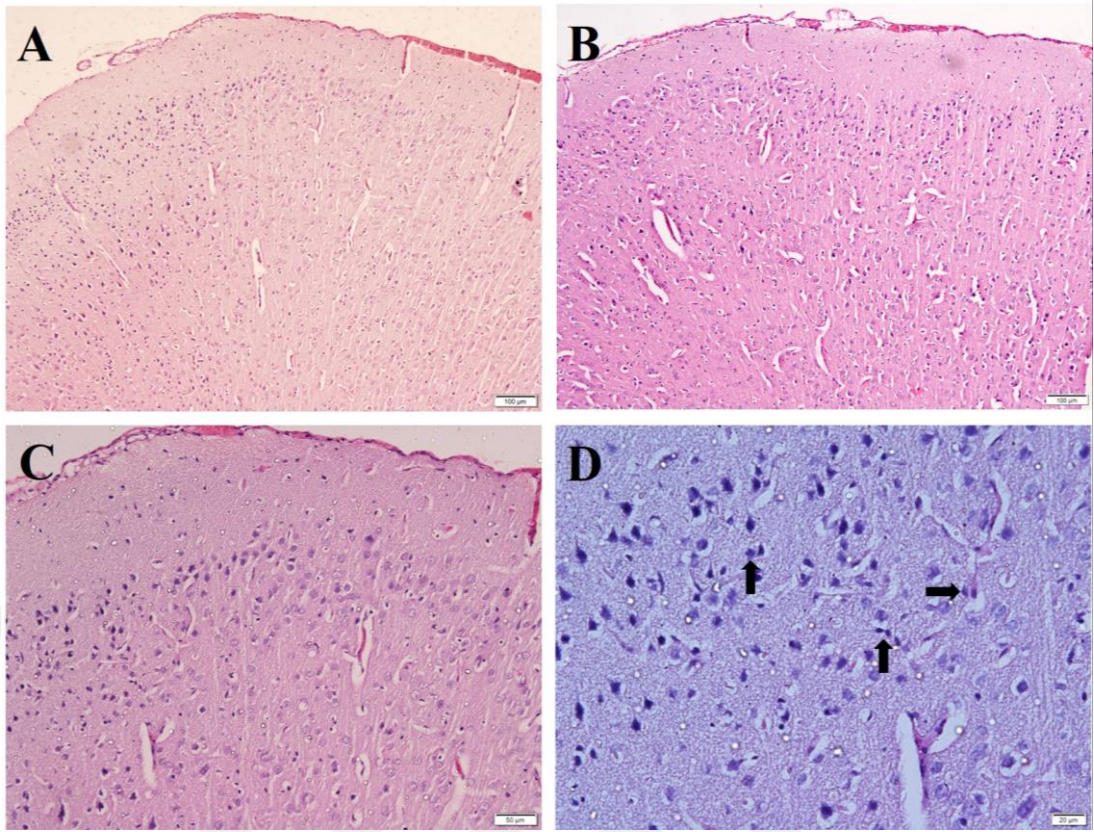


Resim 6.1.2. Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).

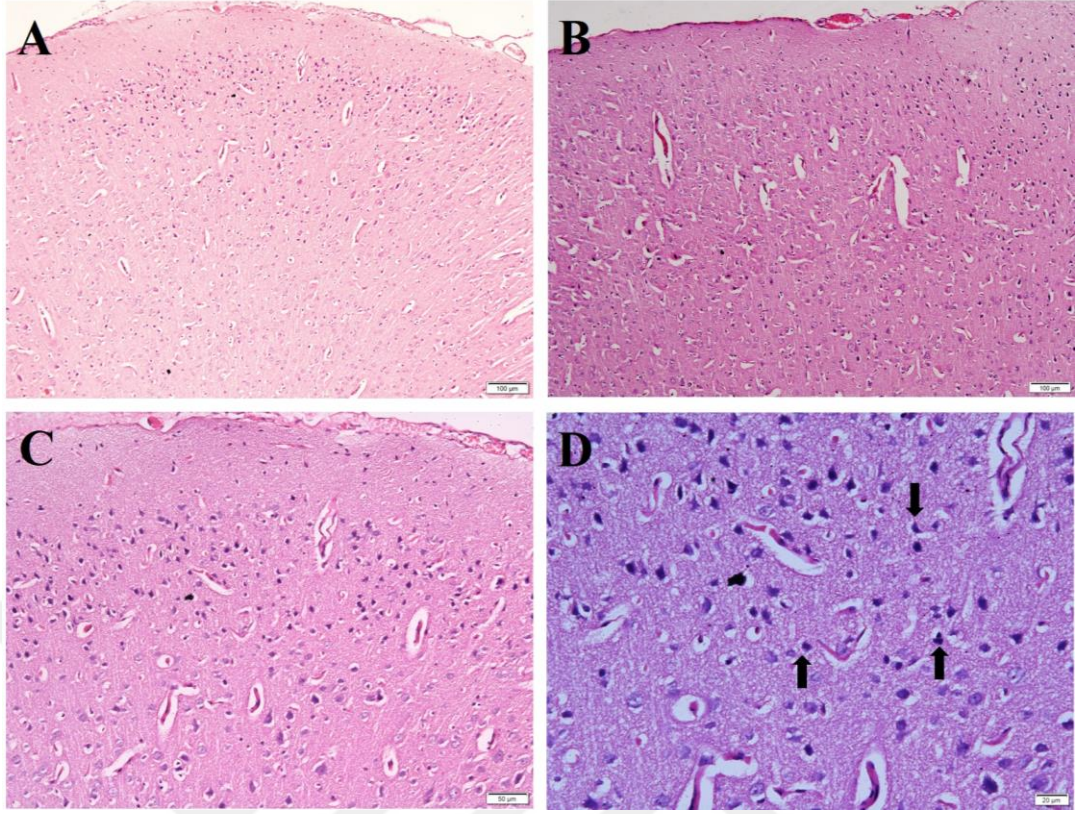


Resim 6.1.3. Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+SF grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).

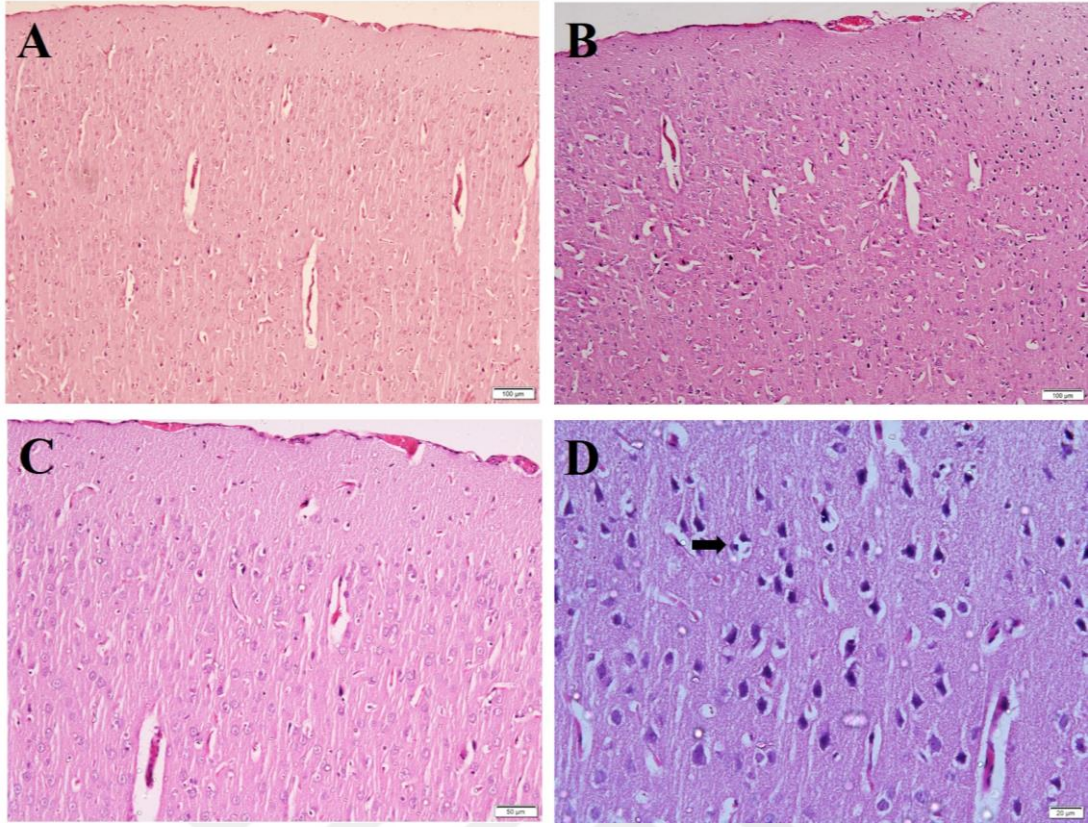
PG uygulaması sonrası, 7. gün örneklerinde doku hasarının gerilediği, en belirgin iyileşmenin 30 mg/kg verilen grupta olduğu saptandı. Özellikle konjesyon ve ödemin azaldığı, eozinofilik boyanma özelliği gösteren hasar görmüş nöron sayısında travma ve travma+SF gruplarına göre azalmanın (** $P<0.01$) meydana geldiği görüldü (**Tablo 6.1.1**) (**Resim 6.1.4**, **Resim 6.1.5**, **Resim 6.1.6**).



Resim 6.1.4. Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+1mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).



Resim 6.1.5. Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+10mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).



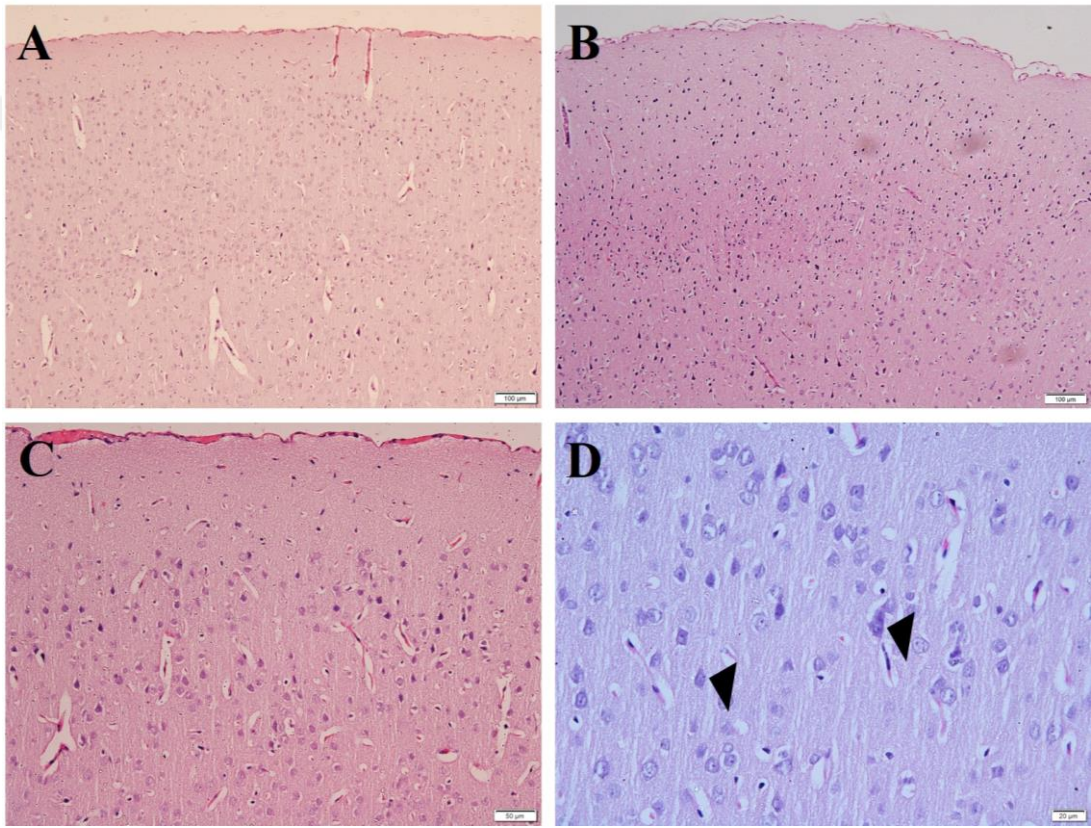
Resim 6.1.6. Kafa travması sonrası 7. güne ait TRAVMA+30mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).

28. güne ait gruplardaki örnekler incelendiğinde kontrol grubunda korteks ve medulla sınırlarının ayırt edilirken, korteksi oluşturan lamina molecularis, lamina granularis externa, lamina pyramidalis externa, lamina granularis interna, lamina pyramidalis interna ve lamina multiformis katmanlarının yer aldığı görüldü. Katmanlarda bulunan nöron ve gliya hücrelerinde sitolojik bir hasar belirlenmedi (**Resim 6.1.7**).

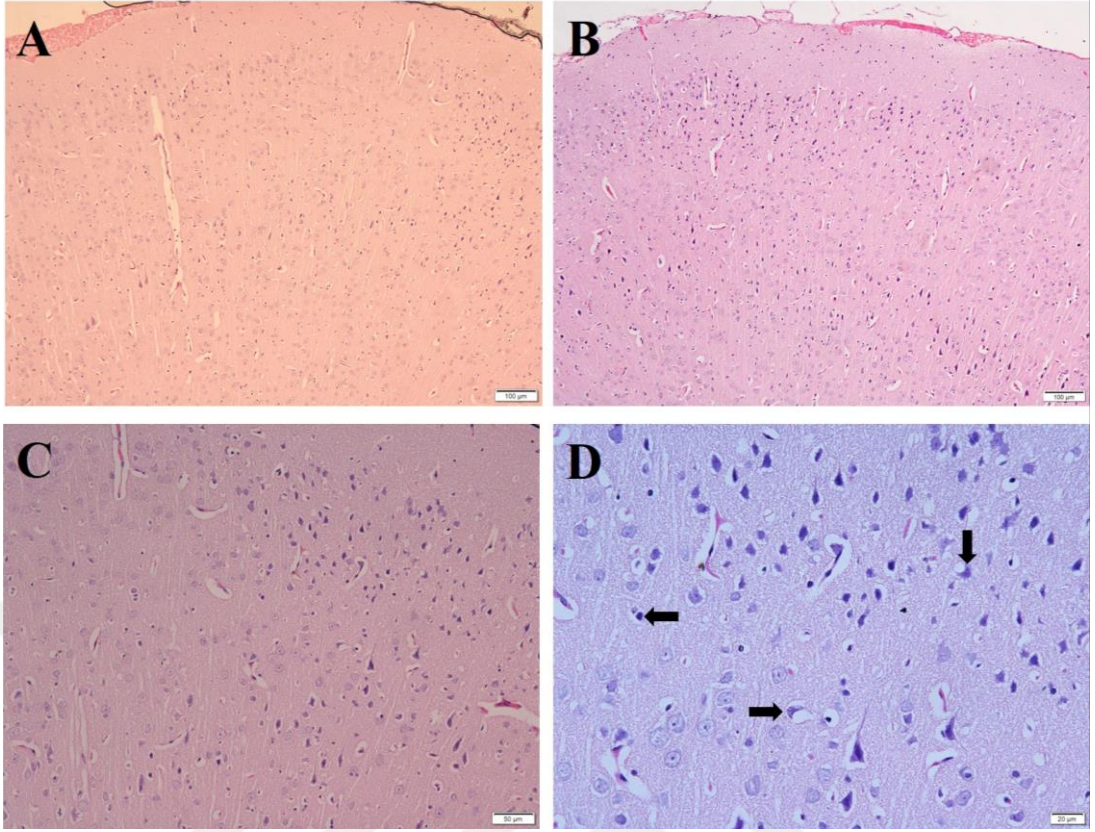
Travma ve travma+SF grubu örneklerinde ise, doku hasarı ile birlikte nöronlarda piknozis ve sitoplazmik vakuollerde kontrol grubuna göre artış görüldü (**P<0.01). Ayrıca konjesyon, ödem, nekroz ve kırmızı nöron sayısı parametrelerinde kontrol grubuna göre artış saptandı (**Tablo 6.1.2**) (**Resim 6.1.8** ve **Resim 6.1.9**).

Tablo 6.1.2. Histopatolojik parametrelerin 28. gün gruplarında değerlendirilmesi.

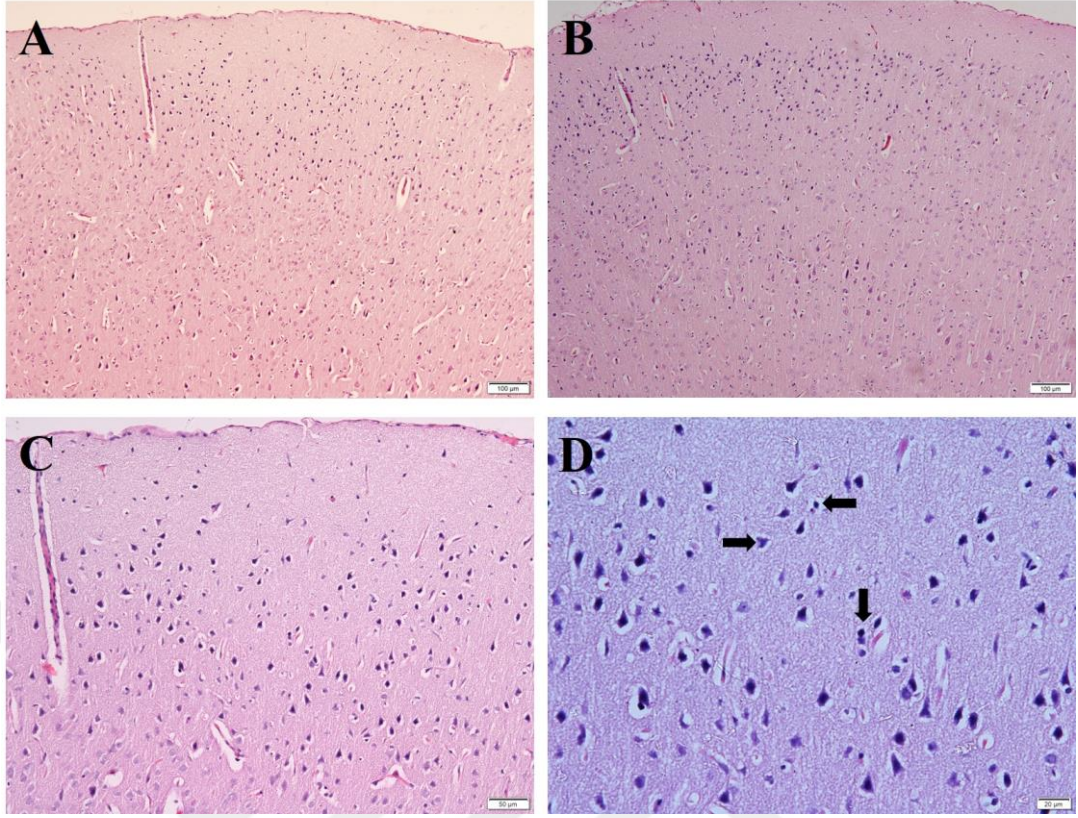
Gruplar Parametreler	Konjesyon	Ödem	İnflamasyon	Nekroz	Kırmızı nöron sayısı
KONTROL	0	0	0	0	0
TRV	3	2	3	3	4
TRV+SF	2	2	2	3	4
TRV+1mg/kg PG	2	2	2	2	2
TRV+10mg/kg PG	1	1	1	1	2
TRV+30mg/kg PG	1	0	1	1	1



Resim 6.1.7. Kafa travması sonrası 28. güne ait KONTROL grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Ok başları: Normal nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).

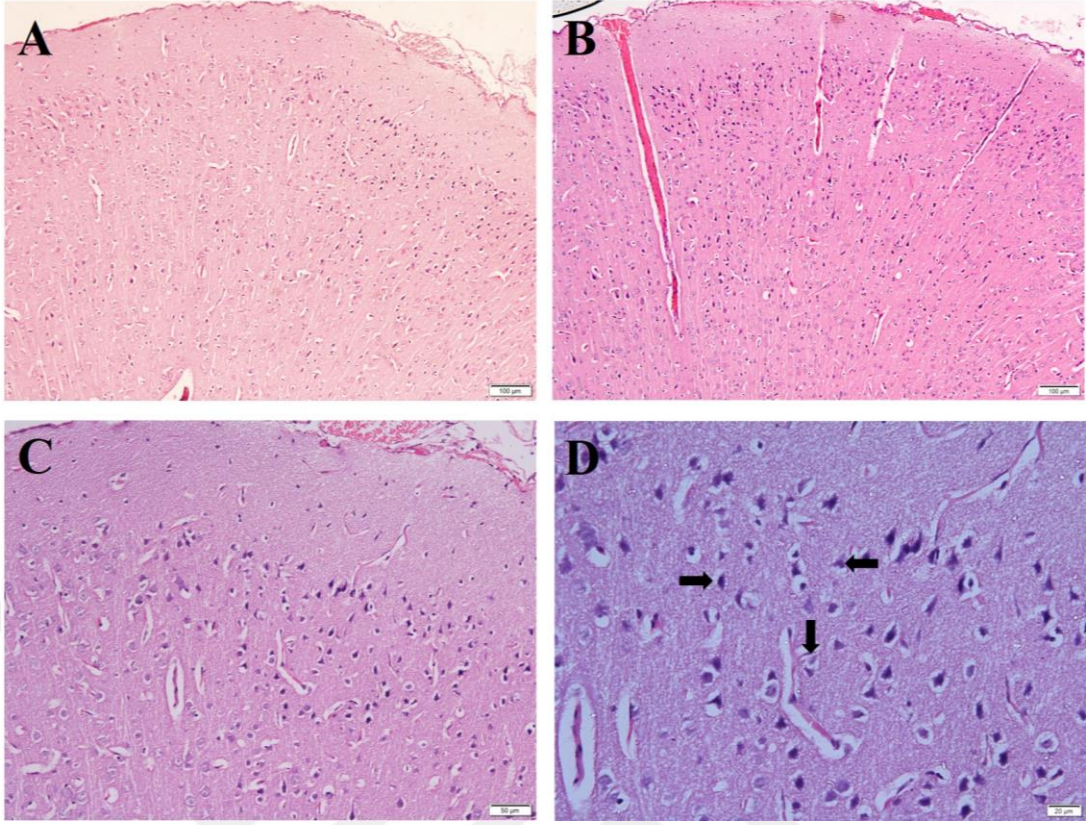


Resim 6.1.8. Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).

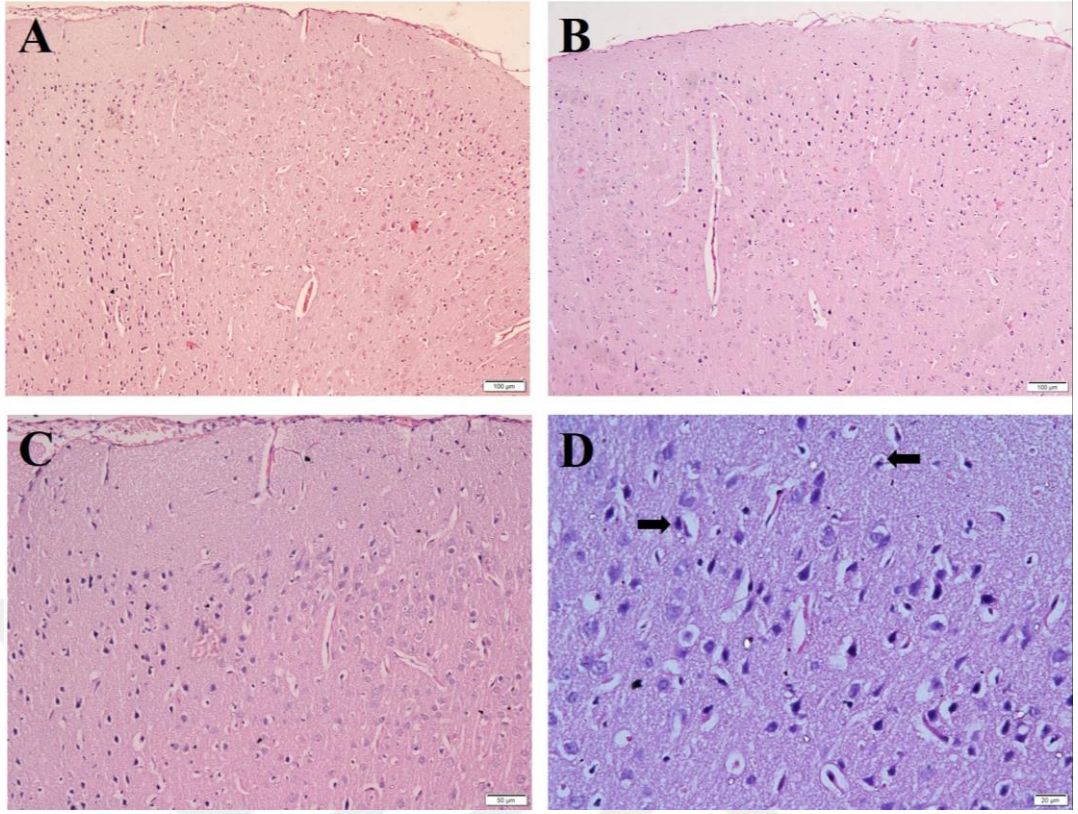


Resim 6.1.9. Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+SF grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A ve B), 50µm (C), 20µm (D).

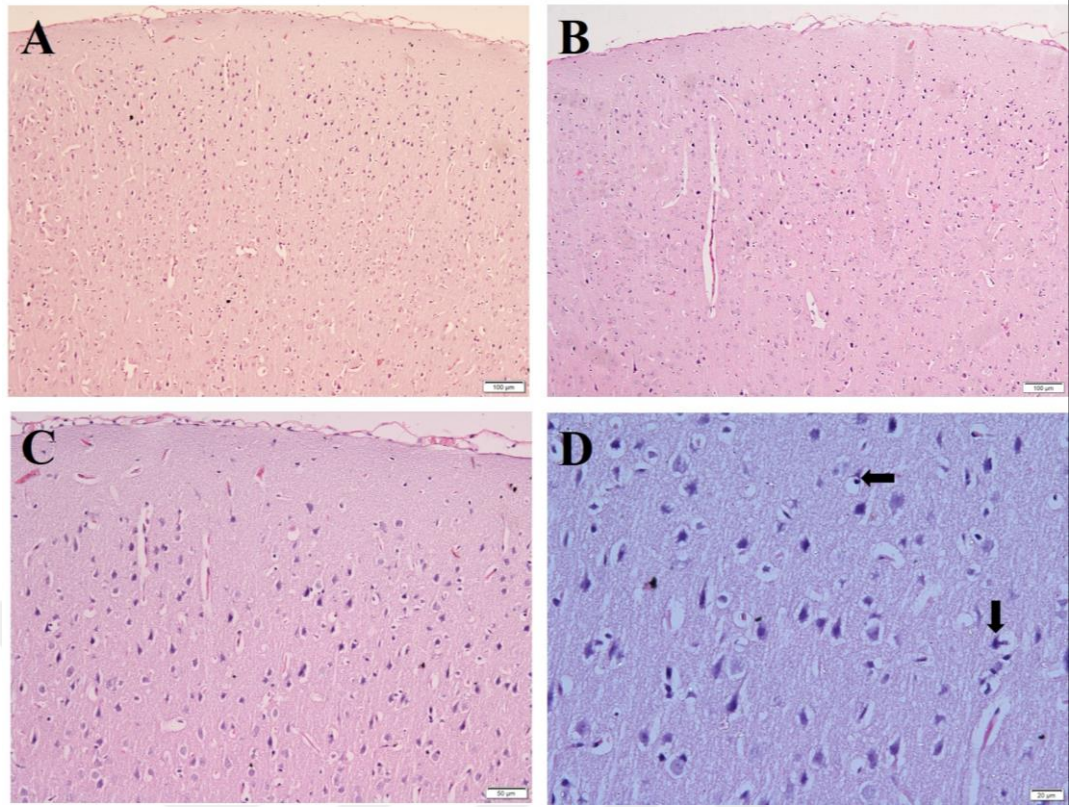
PG uygulaması sonrası, 28. gün örneklerinde histopatolojik parametreler incelendiğinde, doku hasarının doz artışına bağlı olarak travma ve travma+SF gruplarına göre gerilediği belirlendi. Özellikle 30 mg/kg verilen grupta belirgin bir iyileşmenin meydana geldiği saptandı (** $P < 0.01$). Doku hasarı gerilemesinin, konjesyon ve ödem ile birlikte eozinofilik boyanma özelliği gösteren hasar görmüş nöron sayısında azalma şeklinde meydana geldiği görüldü (**Resim 6.1.10, Resim 6.1.11, Resim 6.1.12**).



Resim 6.1.10. Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+1mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).



Resim 6.1.11. Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+10mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).



Resim 6.1.12. Kafa travması sonrası 28. güne ait TRAVMA+30mg/kg PG grubu beyin örneklerinin görüntüleri, H&E boyama, Oklar: Kırmızı nöronlar, Barlar: 100µm (A veB), 50µm (C), 20µm (D).

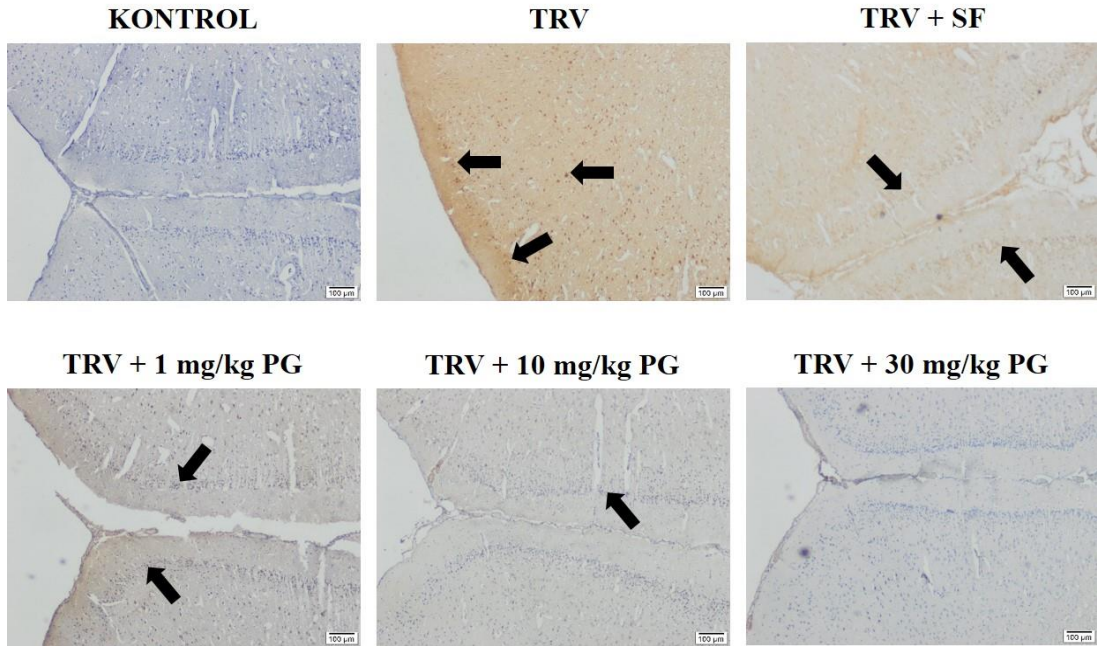
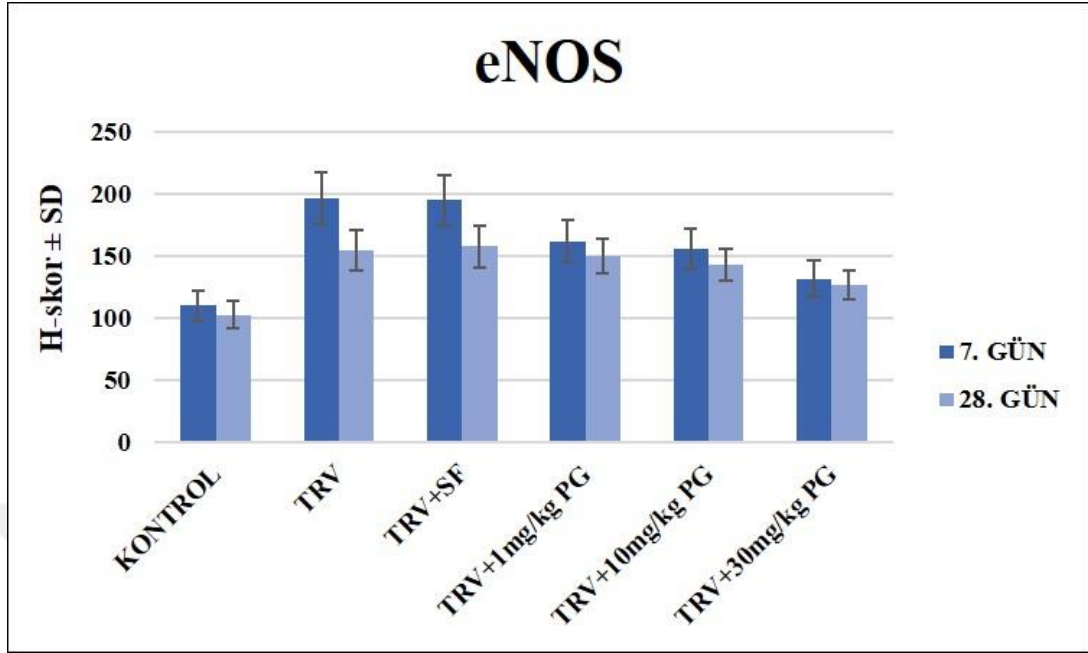
Travma ve travma+SF grupları karşılaştırıldığında hem 7. gün hem de 28. gündeki hasar belirtilerinin benzer olduğu izlendi. Ayrıca, PG uygulanan 7. ve 28. gün örnekleri karşılaştırıldığında, 28. güne ait gruplardaki doku hasarı gerilemesinin daha fazla olduğu, en belirgin gerileme ise 30mg/kg PG grupta saptandı (**P<0.01).

6.2. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI

6.2.1. eNOS

Oksidatif stres belirteçlerinden biri olan eNOS dağılımı 7. güne ait gruplarda incelendiğinde travma grubu beyin korteks örneklerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptandı (**P<0.001) (**Resim 6.2.1.1**). PG uygulanmasıyla eNOS immunoreaktivitesinin azaldığı, anlamlı azalmanın ise 30 mg/kg PG uygulanan grupta olduğu görüldü (**P<0.001) (**Tablo 6.2.1.1**).

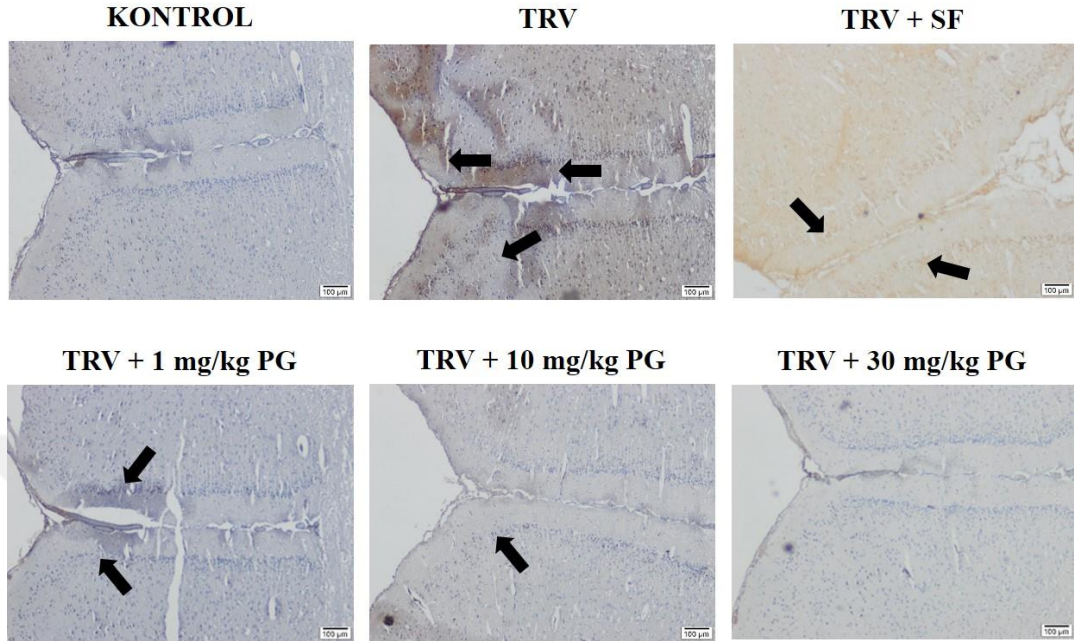
Tablo 6.2.1.1. Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde eNOS dağılımına etkisinin karşılaştırılması.



Resim 6.2.1.1. Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda eNOS dağılımı. Oklar: İmmünpozitif hücreler, Barlar: 100µm.

28. gün grupları karşılaştırıldığında, travma ve travma+SF gruplarına göre eNOS immunoreaktivitesinin uygulama gruplarında azaldığı izlendi. PG'nin 30

mg/kg olarak uygulandığı grupta eNOS boyanması en aza indirilmiş olduğu görüldü (**P<0.001) (**Resim 6.2.1.2**) (**Tablo 6.2.1.1**).



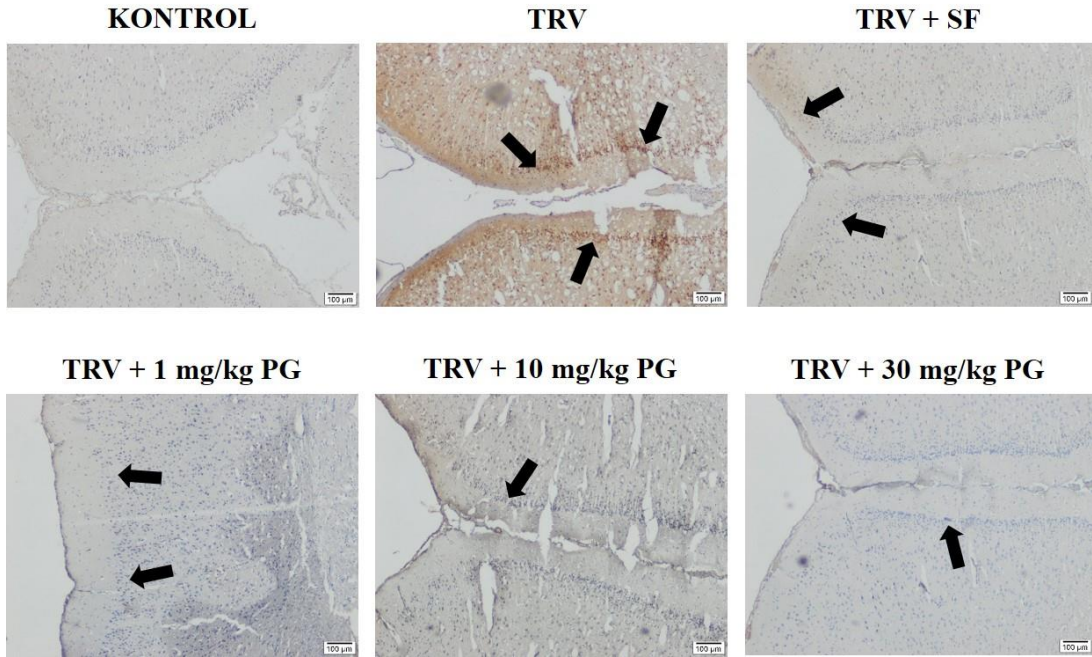
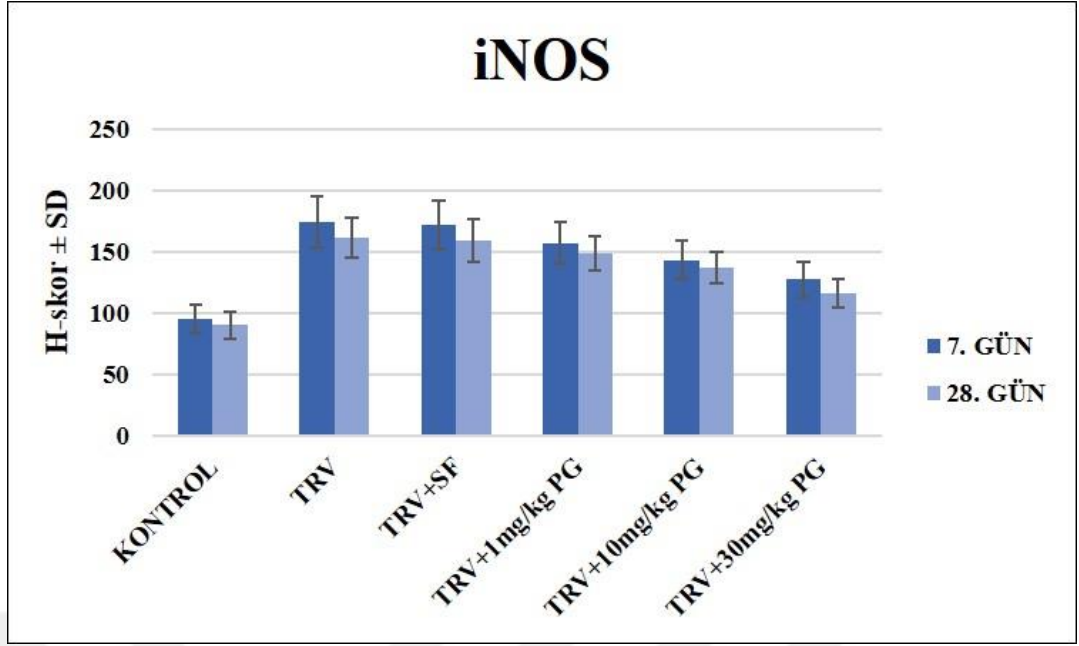
Resim 6.2.1.2. Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda eNOS dağılımı. Oklar: İmmunopozitif hücreler, Barlar: 100µm.

7. ve 28. gün grupları karşılaştırıldığında ise, eNOS dağılımındaki anlamlı azalmanın 28. gün gruplarından 30 mg/kg PG uygulanan grupta olduğu görüldü (**P<0.01).

6.2.2. iNOS

Deney sonrasında sıçanlardan alınan beyin örneklerinde yapılan iNOS immunohistokimyasal boyamalar incelendiğinde 7. güne ait travma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptandı (**P<0.001). Doza bağlı olarak PG uygulanmasıyla iNOS immunoreaktivitesinin azaldığı, anlamlı azalmanın ise 30 mg/kg PG uygulanan grupta olduğu görüldü (**P<0.001) (**Resim 6.2.2.1**) (**Tablo 6.2.2.1**).

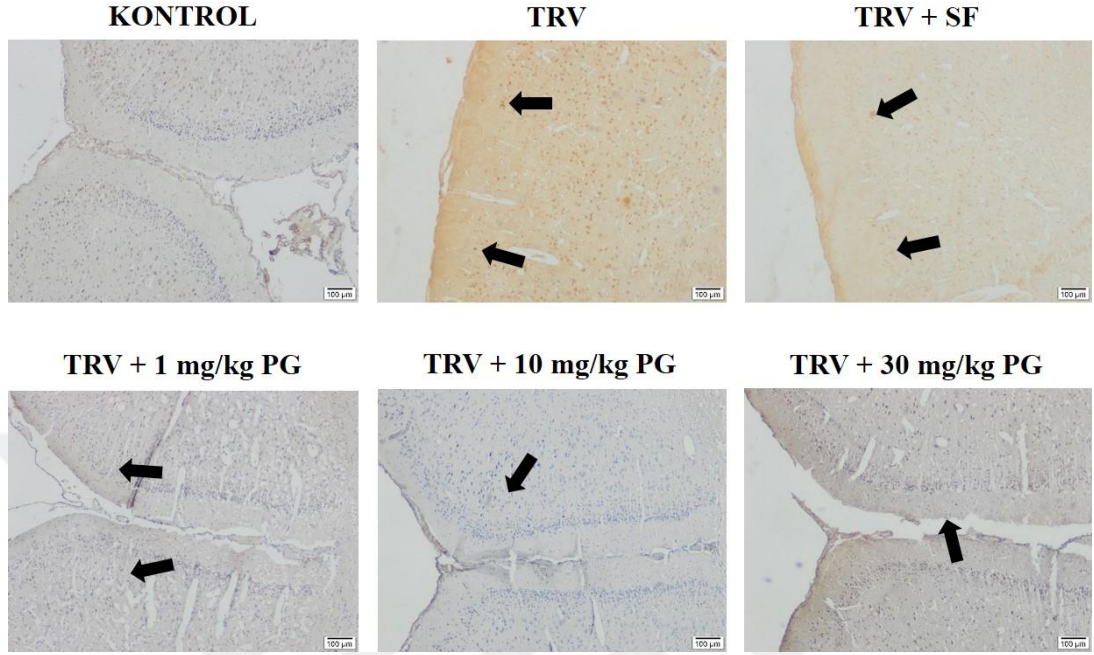
Tablo 6.2.2.1. Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde iNOS dağılımına etkisinin karşılaştırılması.



Resim 6.2.2.1. Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda iNOS dağılımı. Oklar: İmmunopozitif hücreler, Barlar: 100μm.

28. gün grupları karşılaştırıldığında, kontrol ve travma+SF gruplarına göre iNOS immunoreaktivitesinin uygulama gruplarında azaldığı izlenirken, anlamlı

azalma, PG'nin 30 mg/kg olarak uygulandığı grupta saptandı (**P<0.001) (**Resim 6.2.2.2**) (**Tablo 6.2.2.1**).



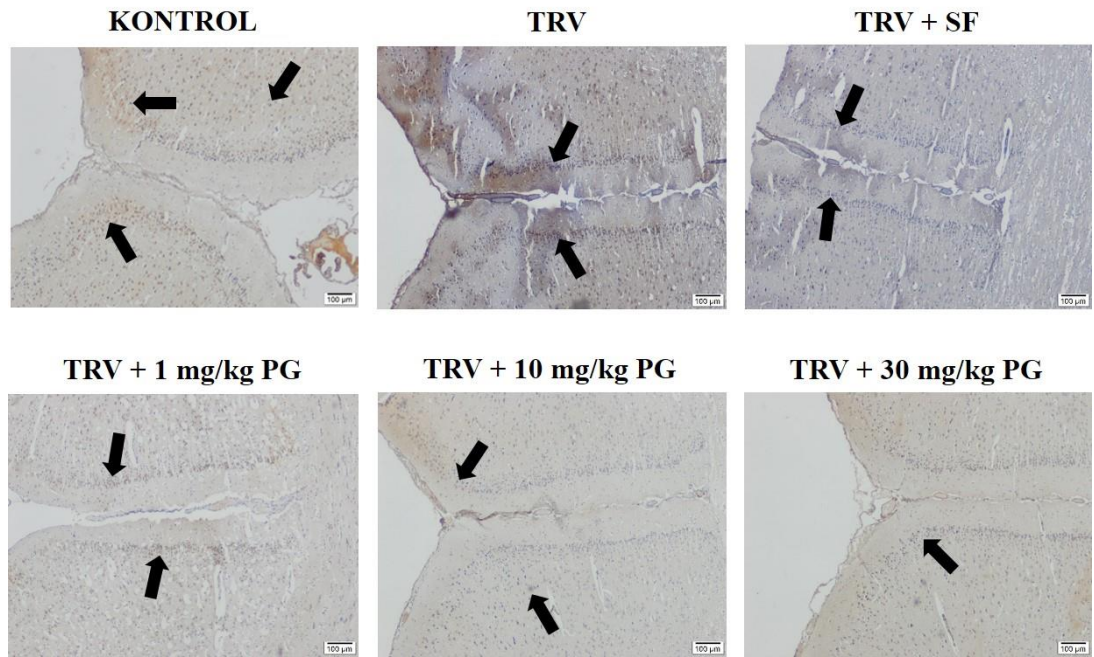
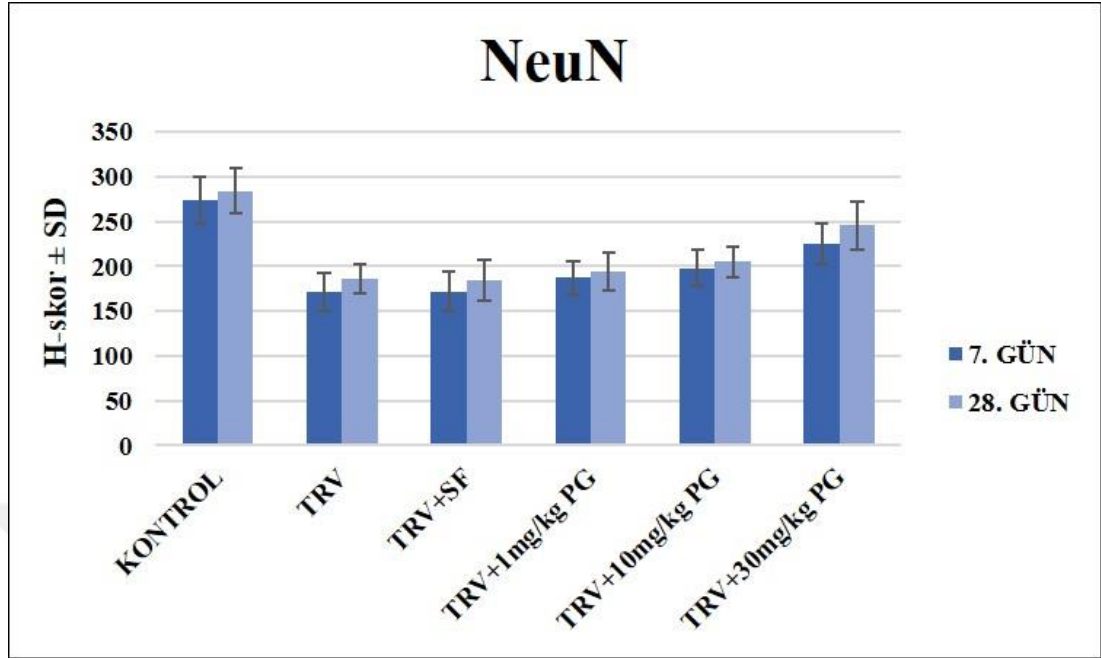
Resim 6.2.2.2. Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda iNOS dağılımı. Oklar: İmmunopozitif hücreler, Barlar: 100µm.

7. ve 28. gün grupları karşılaştırıldığında ise, iNOS dağılımındaki anlamlı azalmanın 28. gün gruplarından 30 mg/kg PG uygulanan grupta olduğu görüldü (**P<0.001).

6.2.3. NeuN

Nöron belirteçlerinden biri olan NeuN immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde, 7. gün kontrol grubunda artmış olan boyanmanın travma grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı (**P<0.001) (**Resim 6.2.3.1**). Uygulama gruplarında ise, doza bağlı olarak PG uygulanmasıyla NeuN dağılımının artmış olduğu, ancak bu artışın kontrol grubuna oranla daha az olduğu görüldü. 30 mg/kg PG uygulanan gruptaki artışın, travma ve travma+SF grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu görüldü (**P<0.001) (**Tablo 6.2.3.1**).

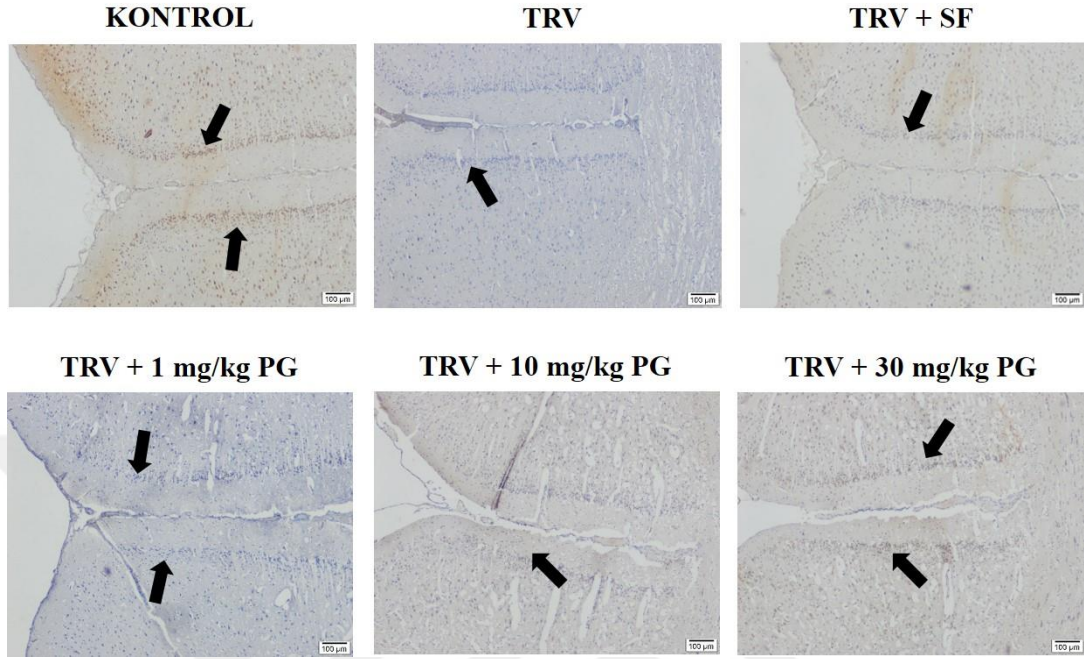
Tablo 6.2.3.1. Deney sonrasında 7. ve 28. günlere ait gruplarda PG uygulamasının beyinde NeuN dağılımına etkisinin karşılaştırılması.



Resim 6.2.3.1. Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda NeuN dağılımı. Oklar: İmmunopozitif hücreler, Barlar: 100μm.

28. gün grupları incelendiğinde, travma ve travma+SF grubunda NeuN boyanmasının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (***P<0.001). PG uygulandığına, artan dozla birlikte NeuN immunoreaktivitesinin arttığı ve anlamlı

artışın 30 mg/kg PG uygulanan grupta meydana geldiği belirlendi (**P<0.001) (Resim 6.2.3.2) (Tablo 6.2.3.1).



Resim 6.2.3.2. Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda NeuN dağılımı. Oklar: İmmunopozitif hücreler, Barlar: 100µm.

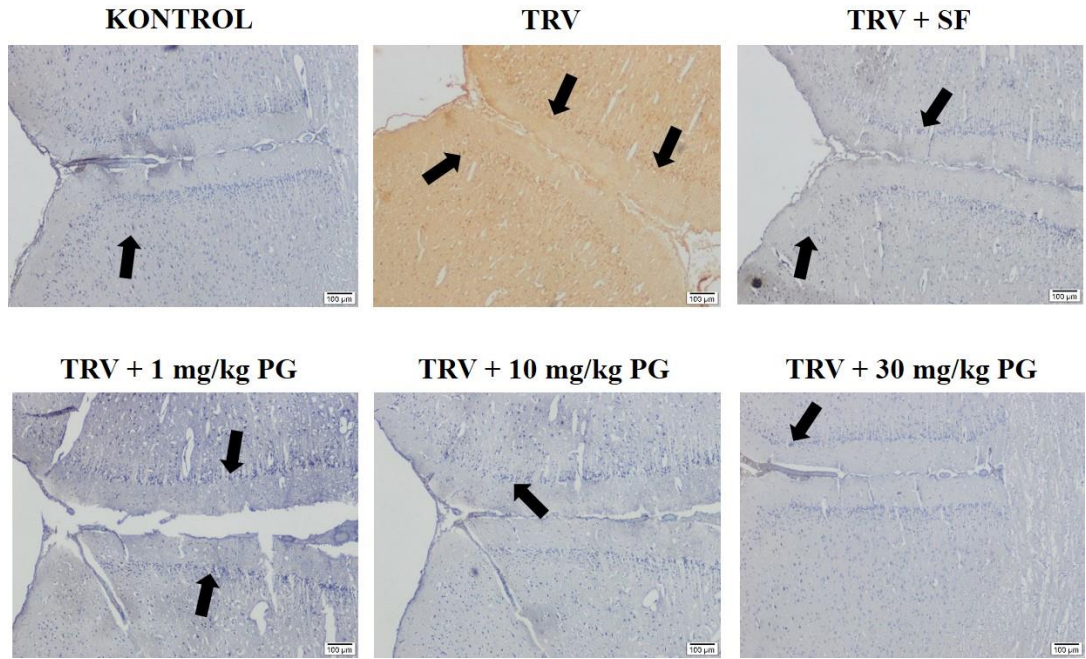
NeuN immunoreaktivitesi açısından 7. ve 28. günlerdeki gruplar arasındaki fark değerlendirildiğinde, 28. gün PG uygulanan gruplarındaki artışın 7. gün gruplarına göre daha fazla olduğu gözlemlendi. 30 mg/kg PG uygulanan 7. ve 28. gün grupları karşılaştırıldığında, 28. gün örneklerinde NeuN artışı, 7. gün örneklerine göre anlamlı bulundu (**P<0.01).

6.2.4. TUNEL

TUNEL boyaması sonrası apoptotik hücre dağılımı incelendiğinde, 7. gün kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif hücrelerin varlığı görülürken travma ve travma+SF gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısının azaldığı (**P<0.01) izlendi (Resim 6.2.4.1). PG uygulanmasıyla doza bağlı olarak apoptotik hücre sayısının azalmış olduğu, ancak bu azalmanın kontrol grubuna oranla daha az olduğu görüldü. 30 mg/kg PG uygulanan gruptaki azalmanın, travma ve travma+SF grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu saptandı (***P<0.001) (Tablo 6.2.4.1).

Tablo 6.2.4.1. Deney sonrasında 7. gün gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.

Gruplar	Apoptotik İndeks
KONTROL	5,1 ± 1,1
TRV	11,7 ± 1,2
TRV+SF	11,5 ± 1,1
TRV+1mg/kg PG	10,2 ± 1,1
TRV+10mg/kg PG	9,6 ± 1,3
TRV+30mg/kg PG	8,7 ± 1,2

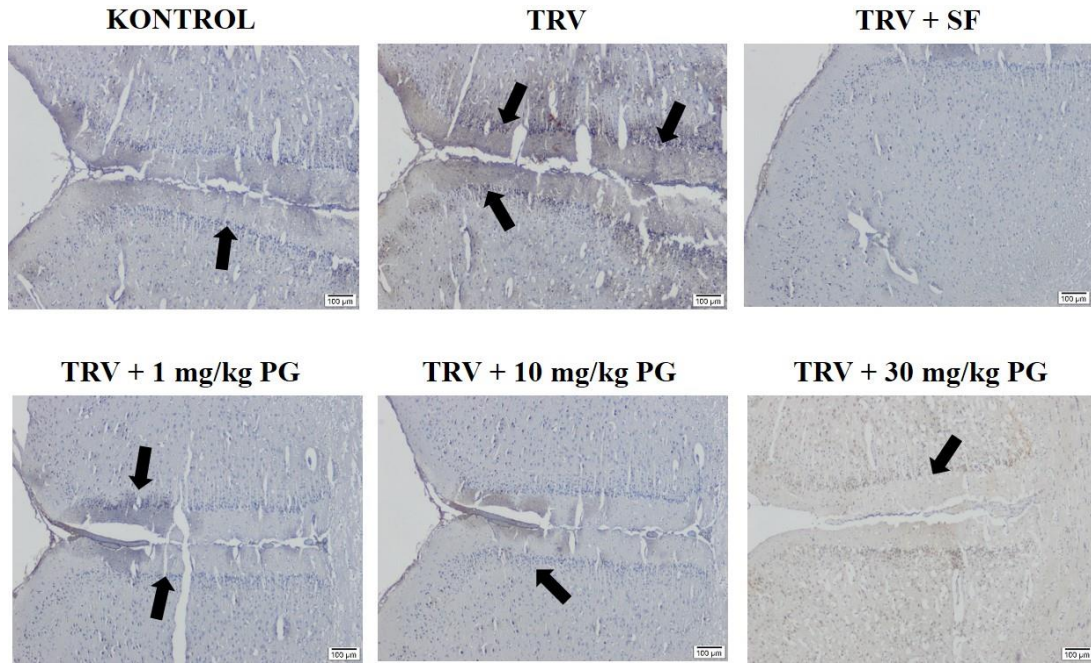


Resim 6.2.4.1. Kafa travması sonrası 7. güne ait gruplarda TUNEL boyama görüntüleri. Oklar: Apoptotik hücreler, Barlar: 100µm.

28. gün grupları karşılaştırıldığında, travma ve travma+SF gruplarındaki apoptotik hücre sayısının, PG uygulanan gruplara göre fazla olduğu tespit edildi (**P<0.01). Apoptotik hücre sayısının en aza indirildiği grubun 30 mg/kg PG grubu olduğu belirlendi (***P<0.001) (**Resim 6.2.3.2**) (**Tablo 6.2.4.2**).

Tablo 6.2.4.2. Deney sonrasında 28. gün gruplarına ait apoptotik indeks değerleri.

Gruplar	Apoptotik İndeks
KONTROL	5,7 ± 1,1
TRV	10,1 ± 1,2
TRV+SF	10,1 ± 1,1
TRV+1mg/kg PG	9,1 ± 1,2
TRV+10mg/kg PG	8,7 ± 1,2
TRV+30mg/kg PG	7,6 ± 1,1



Resim 6.2.4.2. Kafa travması sonrası 28. güne ait gruplarda TUNEL boyama görüntüleri. Oklar: Apoptotik hücreler, Barlar: 100μm.

Apoptotik hücre sayısı açısından 7. ve 28. günlerdeki gruplar arasındaki fark incelendiğinde, 28. gün PG uygulanan gruplarındaki azalmanın 7. gün gruplarına göre daha fazla olduğu gözlemlendi. 30 mg/kg PG uygulanan 7. ve 28. gün grupları karşılaştırıldığında, 28. gün örneklerinde apoptotik hücre sayısındaki azalma, 7. gün örneklerine göre anlamlı bulundu (**P<0.01).

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada, deneysel kafa travması oluşturulan erkek sıçanların beyin örneklerinde, PG verilen ve verilmeyen gruplar arasındaki farklar histopatolojik, immunohistokimyasal ve TUNEL boyamalar aracılığı ile ortaya konuldu. PG verilmeyen travma ve travma+SF gruplarında doku hasarının özellikle konjesyon, ödem, inflamasyon ve nekroz parametrelerinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde artmış olduğu izlendi. PG verilen gruplarda ise, ilacın iyileşme sürecine katkıda bulunduğu, hasar açısından incelenen parametrelerden kırmızı nöron sayısında azalma meydana geldi.

Kafa travması, gelişmiş ülkelerde önemli bir klinik ve ekonomik problem haline gelmeye başlamıştır. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 10 milyon insan, çeşitli kazalar sonucu kafa travması yaşamaktadır ve mortalite oranı %60'a kadar çıkabilmektedir. İki farklı süreçte kendini gösteren bir hasara sebep olmaktadır. Primer hasarda, travma sonrasında hemen ortaya çıkan hücresel ve traktus hasarlar meydana gelirken, sekonder hasarlar uzun saatler veya günler sonrasında ortaya çıkan patolojik olgulardır. Bunlar arasında beyinde ödem, inflamasyon, kan akımında azalma, eksitotoksisite, iyon hemeostazında bozulma ve en önemlisi de iskemidir. Kafa travması tedavisinde yaklaşım inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltıp, nörojenesis ve anjiyogenezisi stimüle ederek hasarlı dokuyu en aza indirmektir. Bu amaçla birçok antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkiye sahip olabileceği düşünülen etken madde veya ilaç uygulamalarını içeren *in vivo* çalışmalar yapılmaktadır (Kılıçarslan 2016).

Nöronlar ileri derecede farklılaşma gösteren hücre olduklarından dolayı kendilerini yenilemeleri ve dokuyu tamir yetenekleri oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalar ile etkin uyaranlar varlığında sinir dokusunun rejenerasyon yeteneğinin tetiklenebileceği gösterilmiştir. Sıçanlarda ağırlık düşürme ile oluşturulan travma sonrası eritropoietin (5,000 U/kg) ve dekstran (5,000 U/kg) uygulandığında oksidatif stres belirteçlerinden malondialdehit seviyesinin düştüğü, glutatyon peroksidaz enzim seviyesinin ise yükseldiği bildirilmektedir. Bunlarla birlikte beyin

dokusundaki ödemin hem eritropoietin hem de dekstran uygulanmasıyla azalmış olduğu saptanmıştır. *Gardenia jasminoides* meyvesinden izole edilen geniposid komponenti, sıçanlardaki kafa travması sonrası 10, 30 ve 60 mg/kg dozlarında gastrik sonda ile verilmiş ve 24 saat sonraki örnekleme beyin ödeminin azalmış olduğu görülmüştür. İnflamatuvar belirteçlerden IL-1beta, IL-6 ve IL-8 plazma seviyelerinde belirgin şekilde düşüş saptanmıştır. Aynı zamanda fosforillenmiş p38 ve p65 ekspresyonunun geniposid uygulaması ile azalması, nöroprotektif etkinin moleküler açıdan ortaya konulmasına katkı sağlamıştır (Yuan ve ark., 2019).

Deforaksamin ile yapılan bir çalışmada oksidatif stres ve damarlanma parametreleri incelenmiştir. Deforaksaminin travma gruplarında HIF-1alfa ve VEGF moleküllerinin ekspresyonunu tetikleyerek beyinde oksidatif stresin azaltılarak anjiyogenezisin başlatıldığı bildirilmiştir. TUNEL pozitif hücrelerindeki azalma ile apoptozun da baskılanmış olduğu, dolayısıyla nöroprotektif etkinin varlığı saptanmıştır (Wang ve ark., 2019). Sıçanlarda kafa travması sonrası oleokantal verilen bir çalışmada, beyin korteksinde TUNEL ile apoptozun ve S100 immunoreaktivitesi ile de gliyozisin oleokantal (30 mg/kg) ile azaltıldığı bulunmuştur (Mete ve ark., 2018). Benzer şekilde bizim çalışmamızda PG uygulanması ile beyinde konjesyon ve ödemde, aynı zamanda TUNEL boyaması ile hücre ölümünde azalma meydana geldiği saptandı.

Kalsiyum bağlayıcı protein olan nörotrofik faktör S100B, intraventriküler yol ile saatte 50 ng olacak şekilde uygulandığında hipokampus bölgesinde sinaptofisin (SYN) ekspresyonunun ve mikrogliyal aktivasyonun tetiklendiği bildirilmektedir. Diğer yandan bu çalışmada GFAP ve S100B immünoreaktivitelerinde, aksonal hasar ve hücre ölümü düzeylerinde nörotrofik faktör S100B uygulamasıyla herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Baecker ve ark., 2019). Oksidatif stres ve inflamasyonu azaltmaya yönelik başka bir çalışmada difenhidraminin inflamatuvar sitokinlerden TNF-alfa ve IL-1beta ekspresyonunda azalma görülmüş; buna paralel olarak malondialdehit, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerindeki değişimlerin de oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır. Apoptozun da yine difenhidraminin dozuna bağlı olarak inhibe edildiği Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 aracılığı ile gösterilmiştir (Pan ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, travma sonrası inflamasyonun ortadan kaldırılmasında veya en aza indirilmesinde inflamatuvar sitokinlerden interlökinlerin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. İnflamasyonla birlikte oksidatif stres belirteçlerinin de doku hasarının giderilmesinde

interlökinlerle benzer sonuçları göstermesi, her iki etkide rol oynayan moleküller arasında ortak bir yolak olabileceğini düşündürmektedir. Benzer durum, araşidonik asit yolak metaboliti 20-HETE'nin sentez inhibitörü olan HET0016, travma sonrası 3.günde inflamatuvar sitokinlerden TNF-alfa ve IL-1beta gen ekspresyonunda azalma, IL-4 ve IL-10 ekspresyonunda ise artma ile inflamasyonda iyileşmeyi sağlamıştır (Shu ve ark., 2019). Allisin ile yapılan bir çalışmada sıçanlardaki kafa travması modelinde nöroprotektif etkisi oksidatif stres ve inflamasyon üzerinden gösterilmiştir. Bu çalışmada travmada sonra verilen 10 ve 50 mg/kg dozlarındaki allisinin beyinde ödemi önemli ölçüde azalttığı ve MDA seviyesinin düşürüldüğü bulunmuştur. Aynı zamanda Western blot analizi ile de Akt ve eNOS ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Allisin beyin dokusunda nöroprotektif etkisini Akt/eNOS'taki bu artış sayesinde gerçekleştirdiği, özellikle eNOS'taki yükselmenin doku hasarının giderilmesinde uyarıcı bir etki oluşturduğu sonucuna varılmıştır (Chen ve ark., 2014). Benzer şekilde DL-3-n-bütilftalitinin de eNOS aktivasyonunu ve sağlayarak nöroprotektif etki gösterdiği aynı zamanda NeuN ile yapılan immunfloresan boyama sonrasında nöron sayısının artmış olduğu bildirilmektedir (Zhao ve ark., 2017). Mete ve ark.,'ların yaptığı bir çalışmada, deneysel kafa travması sonrası uygulanan 10 mg/kg ve 30 mg/kg dozlarındaki oleokantalin beyin dokusunda oksidatif stresi azalttığı ve doku iyileşmesini tetiklediği gösterilmiştir. Bu nöroprotektif etki immunohistokimyasal olarak eNOS ve iNOS immunoreaktivitelerinin ve biyokimyasal analiz sonrası oksidatif stres indeksindeki azalmalar ile saptanmıştır (Mete ve ark., 2018). Vorinostat (100 mg/kg), farelerdeki kafa travmasından 30 dakika önce verilmiş ve beyin dokuları bir sonra alınarak histokimyasal ve biyokimyasal analizlerle oksidatif strese etkisi incelenmiştir. TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre sayısının ve iNOS ile birlikte malondialdehit seviyelerinin azalırken, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla beyindeki hasarın, vorinostatın oksidatif stresi düşürerek onarıldığı ortaya konulmuştur (Xu ve ark., 2018). Bu çalışmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda kafa travması sonrası sıçanlara 1, 10 ve 30 mg/kg PG uygulandı ve deney sonrasında eNOS ve iNOS immunoreaktivitelerinde doz artışına bağlı olarak hem 7. hem de 28. günlerde azalma saptandı. Bununla birlikte apoptotik hücre sayısının da azaldığı ve NeuN pozitif nöron sayısında artış izlenirken, bu PG'nin oksidatif stresi inhibe ederek doku hasarını önlediği sonucuna varıldı.

Antidiyabetik etkiye sahip PG ile yapılan çalışmalar nöroprotektif etkiye sahip olduğunu bildirmektedir. Kafa travması modeli oluşturulan sıçanlarda, PG tek başına ve mezenkimal kök hücre (MKH) ile birlikte kombine edilerek uygulanmış ve nöroprotektif etkisi değerlendirilmiştir. PG'nin MKH'lar ile sinerjistik etki göstererek, nöronal hasarla birlikte mikrogliozis ve astrogliozisin azalmasını sağladığı saptanmıştır. Nöroprotektif etkinin beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ile sağlandığı, özellikle subventriküler zonda nroenezisin varlığı tespit edilmiştir (Das ve ark., 2019). Spinal kord hasarı oluşturulmuş sıçanlarda PG'nin mikrogliya aktivasyonunu tetiklediği bilinmektedir. Siyatik sinir hasarı oluşturulan farelere 4 gün süreyle tek doz 1, 5 ve 25 mg/kg PG uygulanmış ve spinal korda mikrogliya aktivasyonunu doz artışına bağlı olarak uyardığı tespit edilmiştir. PG'nin mikrogliya aktivasyonunu uyarması, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu stimüle etmektedir, dolayısıyla inflamasyonun ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Iwai ve ark. 2008). Benzer şekilde PG, her gün 1 mg/kg olarak uygulandığında travma grubuna kıyasla beyindeki ödemi 3. günde önemli lde azalttığı, nöroprotektif etkinin inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve NF-κB seviyelerini düşürerek gösterdiği kanıtlanmıştır (Deng ve ark., 2019). C57BL/6 farelerde ise travma sonrası  gün boyunca 20 mg/kg PG verilmiş ve 3. gün sonunda beyin demindeki azalmaya inflamatuvar sitokinlerden IL-1β ve NF-κB ile apoptoz belirteci kaspaz-1 seviyelerinde azalma eşlik etmiştir. Bu parametrelerdeki azalmalar 7. ve 14 günlerdeki beyin dokusunda da saptanmıştır (Yi ve ark., 2019). Bizim alışmamızda da, hem 7. hem de 28. günlerde ödem ve gliozisin PG uygulamasıyla azalmış olması, nöroprotektif etkinin bu yolak üzerinden ve oksidatif stresin de baskılanmasıyla sağlandığına işaret etmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

PG uygulamasının, kafa travması modelinde hayvanlarda beyinde doku hasarına karşı koruyuculuğu gösterildi. Yapılan çalışma ile etkin uyaranlar varlığında sinir dokusunun rejenerasyon yeteneğinin tetiklenebileceği gösterilmiştir. Bu nöroprotektif etkinin moleküler mekanizmalarının ve tedavi etkinliğinin araştırılması, hasta yaşam kalitesinin arttırılmasında yeni bir yaklaşım oluşmasına katkı sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

Aksin M. İkinci trimester tarama testi sonrasında amniyon sıvısı ve maternal kanda oksidatif stres değerlendirmesi. Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi (Danışman: Doç. Dr. Mehmet VURAL). Şanlıurfa, 2012.

Akşit H. Deneysel Olarak Oluşturulan Fibrosarkomalarda Programlanmış Hücre Ölümünün Çekirdekteki DNA Parçalanması Tayini ve İmmunohistokimyasal Olarak Gösterilmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK). Aydın, 2007.

Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve oksidatif stres. Turk J Biochem 2006; 31(2); 51–56.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001; 357(Pt 3):593-615.

Ayhan S, Mut M. Travmatik Beyin Hasarında Çok İşlevli Nöromonitörizasyon: Güncel Literatürün Özeti. Türk Nöroşirürji Derneği Nörotravma Bülteni, 2008, Sayı:3.

Adams C, Bazzigaluppi P, Beckett TL, Bishay J, Weisspapir I, Dorr A, Mester JR, Steinman J, Hirschler L, Warnking JM, Barbier EL, McLaurin J, Sled JG, Stefanovic B. Neurogliovascular dysfunction in a model of repeated traumatic brain injury. Theranostics. 2018;8(17):4824-4836. doi: 10.7150/thno.24747.

Aydemir, I., Kum, Ş., Tuğlu, M.İ., 2018. Histological investigations on thymus of male rats prenatally exposed to bisphenol A. Chemosphere. 206:1-8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.145.

Bachmann S and Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization and fonction. Am J Kid Diseases 1994; 24(1): 112-29.

Baecker J, Wartchow K, Sehm T, Ghoochani A, Buchfelder M, Kleindienst A. Treatment with the Neurotrophic Protein S100B Increases Synaptogenesis after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2019; doi: 10.1089/neu.2019.6475.

Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection: A role for nitric oxide. *Physiol Behav* 2002;77:291-299.

Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23:205–215. 22.

Chen XM, Levine SA, Splinter PL, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ, Paya CV, La Russo NF. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 2001, 120: 1774-1783.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases-an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008, 151 (1): 10-27.

Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin* 2007; 25(4): 487-501.

Coşkun G ve Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv* 2011, 20:145.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. WB Philadelphia, Saunders Company, 2009, pp. 1-30.

Das M, Mayilsamy K, Tang X, Han JY, Foran E, Willing AE, Mohapatra SS, Mohapatra S. Pioglitazone treatment prior to transplantation improves the efficacy of human mesenchymal stem cells after traumatic brain injury in rats. *Sci Rep*. 2019;9(1):13646. doi: 10.1038/s41598-019-49428-y.

Dawson VL. Nitric oxide: role neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (Australia) 1995;22(4):305-8.

Demircan E. Romatoid artrit total antioksidan status (TAS), total oksidan status (TOS), iskemi modifiye albumin (İMA) düzeylerinin hastalık aktivitesi ve insulin direnci ile ilişkisi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi (Danışman: Prof. Dr. Can DUMAN). Çanakkale, 2013.

Deng Y, Jiang X, Deng X, Chen H, Xu J, Zhang Z, Liu G, Yong Z, Yuan C, Sun X,

Wang C. Pioglitazone ameliorates neuronal damage after traumatic brain injury via the PPAR γ /NF- κ B/IL-6 signaling pathway. *Genes Dis.* 2019 Jun 6;7(2):253-265. doi:

10.1016/j.gendis.2019.05.002.

Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM, Pourmorad F. Nitric oxide radicalscavenging potential of some Elburz medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(32), pp. 5212-5217.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495–516.

Fidancı ŞB ve Gümüş LT. Nitrik oksit ölçüm yöntemleri. *Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg* 2011; 4(3):1-8.

Fulda D. Molecular pathways: targeting inhibitor of apoptosis proteins in cancer- from molecular mechanism to therapeutic application. *Clin Cancer Res* 2013; 20(2); 289–95.

Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(6).

Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg* 2012; Cilt 3, Sayı 11.

Geller DA, Lowenstein CS, Shapiro RA, Nussler AK, Disilvio N, Wang S. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 3491- 5.

Gergin İŞ. Sıçanlarda farklı kafa travması modellerinin hipotalamo-hipofizier aksta hasar oluşturma etkinliğinin histolojik, biyokimyasal verilerle ve davranış testleriyle değerlendirilmesi. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi (Danışman: Prof. Dr. Ahmet Selçuklu).Kayseri, 2015.

Goyal K, Hazarika A, Khandelwal A, Sokhal N, Bindra A, Kumar N, Kedia S, Rath GP. Non- Neurological Complications after Traumatic Brain Injury: A Prospective Observational Study. Indian J Crit Care Med. 2018;22(9):632-638. doi: 10.4103/ijccm.IJCCM_156_18

Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. Acta Naturae 2105; vol 7, no 2 (25), pp.42-47.

Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J Biol Chem. 1991; 266(34):22789-91.

Hökelek M. Patogenez ve apoptozis (hücresel hasar mekanizmaları, programlanmış hücre ölümü). Özcel MA. Tanyüksel M. Eren H. eds. *Moleküler Parazitoloji*. Meta Basım, Bornova, İzmir, 2009; pp.31-47.

Iwai S, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Ozaki M, Kishioka S. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and microglial activation in mice with peripheral nerve injury. Drug Discov Ther. 2008;2(6):353-6.

İnci A, Yıldırım A, Yavuz A, Düzlü Ö. Bazı protozoon enfeksiyonlarında apoptozis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2009; 6(2):121-133.

Katz EG, Moustafa AA, Heidenberg D, Haney N, Peak T, Lasker GF, Knoedler M, Rittenberg D, Rezk BM, Abd Elmageed ZY, Yafi FA, Sikka S, Abdel-Mageed AB, Hellstrom WJ. Pioglitazone Enhances Survival and Regeneration of Pelvic Ganglion Neurons After Cavernosal Nerve Injury. *Urology*. 2016;89:76-82. doi:10.1016/j.urology.2015.12.021.

Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:181643. doi: 10.1155/2015/181643.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AE. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

Kılıçarslan B. Deneysel hayvan modelinde ağır kafa travması sonrası sildenafil'in etkinliğinin değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi (Danışman: Doç. Dr. Hamit Selim Karabekir). İzmir, 2016.

Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 39:63-9.

Leppänen T, Korhonen R, Laavola M, Nieminen R, Tuominen RK, Moilanen E. Down-regulation of protein kinase C δ inhibits inducible nitric oxide synthase expression through IRF1. *PLoS One* 2013;8(1):e52741.

Levin HS, Diaz-Arrastia RR. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury. *Lancet Neurol*. 2015; 14(5):506-17.

Liu J, Wang Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:294303. doi: 10.1155/2015/294303.

Lowenstein CJ and Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992;70(5):705-7.

Lowensein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic Messenger. Ann Intern Med 1994; 120(3):227-37.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997;15:323 - 50.

Marletta MA. Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. J Med Chem 1994; 37: 1899-907.

Mete M, Aydemir I, Unsal UU, Collu F, Vatandas G, Gurcu B, Duransoy YK, Taneli F, Tugrul MI, Selcuki M. Neuroprotective Effects of Oleocanthal, A Compound in Virgin Olive Oil, in A Rat Model of Traumatic Brain Injury. Turk Neurosurg 2018; 28(6):858-865 doi: 10.5137/1019-5149.JTN.21417-17.2.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 1992; 116:201–11.

Muratoğlu S. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı bireylerde konvansiyonel inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerinin düzeyleri. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN). Ankara, 2014.

Moncada S and Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. N Engl J Med 2002;329: 11.

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. J Leukoc Biol (USA) 1993;54(2):171-8.

Öğüt S ve Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2012; 19(2)/68-74.

Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler, Türk Toraks Dergisi 2003, Cilt 4, Sayı 1, Sayfa(lar) 088-094.

Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2012;16(11):1215–1228. doi: 10.1089/ars.2012.4529.

Shu S, Zhang Z, Spicer D, Kulikowicz E, Hu K, Babapoor-Farrokhran S, Kannan S, Koehler RC, Robertson CL. Administration of a 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Synthesis Inhibitor Improves Outcome in a Rat Model of Pediatric Traumatic Brain Injury. *Dev Neurosci*. 2019;1-11. doi: 10.1159/000500895.

Pan W, Cao Z, Liu D, Jiao Y. Protective Effect of Diphenhydramine against Traumatic Brain Injury in Rats via Modulation of Oxidative Stress and Inflammation. *Pharmacology*. 2020;105(1-2):47-53. doi: 10.1159/000502767.

Perdigoto AL, Young LH, Inzucchi SE. Pioglitazone and cardiovascular risk reduction: time for a second look? *Cardiovasc Endocrinol*. 2017;6(2):55-61. doi: 10.1097/XCE.0000000000000110.

Petrova ES, Isaeva EN, Korzhevskii DE. Development of rat embryonic spinal ganglion cells in damaged nerve. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Sep;157(5):637-40. doi: 10.1007/s10517-014-2633-7.

Star RA. Nitric oxide. *Am J Med Sci* 1993;306(5):348-58.

Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab* 2014; 20:573–591. 23.

Tauchi M, Tejada de Rink MM, Fujioka H, Okayama S, Nakamura KI, Dietel B, Achenbach S, Kollmar R, Schwab S, Ushijima K, Harada H. Targeted Temperature Management: Peltier's Element-Based Focal Brain Cooling Protects Penumbra Neurons from Progressive Damage in Experimental Cerebral Ischemia. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2018;doi: 10.1089/ther.2017.0055.

Tejero J and Stuehr D. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthase. IUBMB Life.2013;65(4):358-65.

Ucar T, Tanrioer G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S. Modified experimental mild traumatic brain injury model. J Trauma. 2006;60(3):558-65.

Wang K, Jing Y, Xu C, Zhao J, Gong Q, Chen S. HIF-1 α and VEGF Are Involved in Deferoxamine-Ameliorated Traumatic Brain Injury. J Surg Res. 2020;246:419-426. doi: 10.1016/j.jss.2019.09.023.

Wyllie AH, Morris RG, Smith Al, Dunlop D. Chromatine cleavage in apoptozis:association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol 1984; 142: 67-77.

Xu J, Shi J, Zhang J, Zhang Y. Vorinostat: a histone deacetylases (HDAC) inhibitor ameliorates traumatic brain injury by inducing iNOS/Nrf2/ARE pathway. Folia Neuropathol 2018;56(3):179-186. doi: 10.5114/fn.2018.78697.

Yau H, Rivera K, Lomonaco R, Cusi K. The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. Curr Diab Rep 2013; 13:329–341.

Yıldırım İH, Koçak N, Yıldırım SC. Programlı hücre ölümü; literatür bilgilerinin Türkçe derlemesi. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2012: 2(3):58-66.

Yi HJ, Lee JE, Lee DH, Kim YI, Cho CB, Kim IS, Sung JH, Yang SH. The role of NLRP3 in traumatic brain injury and its regulation by pioglitazone. J Neurosurg 2019; 1-9. doi: 10.3171/2019.6.JNS1954.

Yuan J, Zhang J, Cao J, Wang G, Bai H. Geniposide Alleviates Traumatic Brain Injury in Rats Via Anti-Inflammatory Effect and MAPK/NF-kB Inhibition. Cell Mol Neurobiol. 2019; doi: 10.1007/s10571-019-00749-6.

Zhao Y, Lee JH, Chen D, Gu X, Caslin A, Li J, Yu SP, Wei L. DL-3-n-butylphthalide induced neuroprotection, regenerative repair, functional recovery and psychological benefits following traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int* 2017;111:82-92. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.017



10. EKLER

Ek 1. Yönetim Kurulu Kararı



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
07.09.2020	30	1

Karar 1-b) Farmakoloji Anabilim Dalı tezli yüksek lisans programı öğrencisi Işıl AYDEMİR'in tez konusunun, Etik Kurul Onayı alınması kaydı ile **"Yaygın Beyin Hasarı Sonrasında Pioglitazon'un Nöroprotektif Etkisi"** olarak kabul edilmesine ve öğrencinin 2. tez danışmanı olarak Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'nun atanmasına **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

e-imzalıdır Prof.Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü	İzinli Prof.Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Doç.Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Doç.Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Prof.Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	e-imzalıdır Doç.Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Aynur PALAMUTÇUOĞLU Enstitü Sekreteri	

Aslı Gibidir
10.01.2020

Dr. Öğr. Üyesi Süheyla RAHMAN
Enstitü Müdür Yardımcısı

Ek 2. Etik Kurul Kararı

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİHİ / NO	12 / 09 / 2017 / 77.657.435 -		
ARAŞTIRMACI ADI	Yaygın Beyin Hasan Sonrasında Plegliozom'un Nöropatolojik Etkisi		
SORULAN ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Kamil VURAL		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Uzm. Dr. İşıl Aydın, Prof. Dr. Mehmet İbrahim Tugan		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGEYİ	08.09.2017 Tarih ve 39069 sayılı araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma ile ilişkisi Olmaz Oysa	Toplantıya Katılımı Var Oysa
Prof. Dr. Emin KURT SGL Fisiyoloji AD	<i>(İmza)</i>	☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD	<i>(İmza)</i>	☐	☒
Prof. Dr. İbrahim YATILIMCI Anestezi AD	<i>(İmza)</i>	☐	☐
Doç. Dr. İsmail GÜRHAN DJI İYİ MD	<i>(İmza)</i>	☐	☐
Doç. Dr. Kamil VURAL Fisiyoloji AD	<i>(İmza)</i>	☐	☒
Yrd. Doç. Dr. Selim KATAY Tıbbi Onk AD	<i>(İmza)</i>	☐	☐
Yrd. Doç. Dr. R. R. R. R. Veteriner Hekim	<i>(İmza)</i>	☐	☐
Doç. Dr. R. R. R. R. Tıbbi Onk AD	<i>(İmza)</i>	☐	☒

Etik Kurulunuzun karar, yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunda Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak işlenen bilgilere Etik Kuruluna za zararında bu işlemler konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

(İmza)
Prof. Dr. Emin KURT
Başkan



Ek 3. Benzerlik Raporu

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

.....
..... Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı... Yaygın Beyin Hasarı Sonrasında Pioglitazon'un Nöroprotektif Etkisi

Tezime ilişkin...18/11/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 26..'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

18.11.2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı : İsl AYDEMİR
Öğrenci No : 131339003
Anabilim Dalı : Farmakoloji
Programı : Tezli Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
Prof. Dr. Kamil Vural



Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süzülmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5 İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.

7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

Ek 4. Özgeçmiş

Adı ve Soyadı: **Işıl AYDEMİR**

T.C. No: 55486305040

Doğum Tarihi: 15.04.1981

Doğum Yeri: Saruhanlı

Akademik Unvanı: Dr. Öğr. Üyesi

İş Telefonu: 0 388 225 25 67

Cep Telefonu: 0 542 473 95 56

İş Adresi: Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ad.

E-postası: isil_aydemir@yahoo.com

Bildiği Yabancı Diller (Puan ve Yılı): İngilizce/ 75,000 / Yüksek Öğretim Kurumları

Yabancı dil Sınavı (YÖKDİL)- 05.03.2017

Uzmanlık Alanı: Histoloji ve Embriyoloji

Eğitim:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi	1999-2003
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji	Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2003-2006
Y. Lisans	Histoloji-Embriyoloji	Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2006-2009
Doktora	Histoloji-Embriyoloji	Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2009-2012
Doktora(Yatay geçiş)	Histoloji-Embriyoloji	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012-2016

Yüksek Lisans Tez Başlığı (özeti ekte) ve Tez Danışman(lar)ı:

Tez Başlığı	Tez Danışmanı
Normal ve Alkol ile Uyarılmış Piliç Embriyosu Nöral Tüp Gelişiminde Glikozaminoglikanların (GAG) Histokimyasal Olarak Belirlenmesi	Öğr.Gör.Dr. Beyhan GÜRCÜ Zooloji Anabilim Dalı, Fen- Edebiyat Fakültesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Primer ve Metastatik İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarında α -Laktalbumin ve Sulindac'ın Mitokondriyal Apoptotik Yolak Üzerinden Etkisinin İmmünohistokimya ve Elektron Mikroskopik Yöntemlerle Değerlendirilmesi	Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi
---	--

Doktora Tezi/S.Yeterlik Çalışması/Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı (özeti ekte) ve Danışman(lar)ı:

Tez Başlığı	Tez Danışmanı
Kök Hücre Uygulamalarının İmplantasyona Etkileri	Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Dr. Öğr. Üyesi	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ad.	2017-Halen
Histoloji-Embriyoloji Ad. Başkan V.	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi,	2018-Halen

Diğer Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Tıp Fakültesi Farabi Koordinatörü	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi	2017-Halen

Yayınlar

1. Sohrabi M, Kalati FA, Vatansever S, Abbasi MM, Roshangar L, Khaki AA, Tuğlu İM, **Aydemir I**, Duster Y, Javadzadeh BY, Rad JS. Effect of dietary and topical Celecoxib on expression of bcl-2, bax, c-erb-B2 and Ki67 in carcinogen-induced tongue carcinoma in rat. Pak. J. Biol. Sci., 2009, 12(10):750-7.

2. Türköz-Uluer E, **Aydemir I**, İnan S, Özbilgin K, Vatansever HS. Effects of 5-fluorouracil and gencitabine on breast cancer cell line (MCF-7) via the JAK/STAT pathway, *Acta Histochemica*, 2011, doi: 10.1016/acthis.2011.11.01.
3. **Aydemir I** and Gürcü B. Histochemical determination of glycosaminoglycans (GAGs) in normal and ethanol-induced chick embryo during neural tube development, *African Journal of Biotechnology*, 2011, Vol.10(53): 10817-10824.
4. Öztürk Ş, **Aydemir I**, Erdoğan-Öztrük K, Özkut MM, Yeşil H, Varol T, Tuğlu İ. Kök hücre ve nöronal rejenerasyon. *Turkiye Klinikleri J Neur*, 2013;8(3):86-92.
5. Görgülü K, Gökçe B, **Aydemir I**, Özbilgin MK, Vatansever HS. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on α -Lactalbumin and Sulindac treated colon cancer cells: ELF-EMF and colon cancer. *Medical Science and Discovery* 2014; vol.1 no.1, p:22-26.
6. Mete M, **Aydemir I**, Tuğlu I, Selcuki M. Neurotoxic effects of local anesthetics on the mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Biotech Histochem*. 2015, 90(3):216-22.
7. Özdal-Kurt F, **Aydemir I**, Özkut M, Cezayirli E, Tuğlu Mİ. Anatomy of stem cells. *Anatomy* 2015; 9(2):86-90.
8. Yıldız M, **Aydemir I**, Kum Ş, Eren Ü. The Distribution and Heterogeneity of Mast Cells in the Cecum of Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22(2):197-202.
9. Mete F, Tarhan H, Celik O, Akarken I, Vural K, Ekin RG, **Aydemir I**, Ilbey YO. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian J Androl*. 2017; 19(1):43-46. doi: 10.4103/1008-682X.171570.
10. Öztürk T, Vural K, Tuğlu İ, Var A, Kurdal T, **Aydemir I**. Acute and Chronic Pretreatment with Atenolol Attenuates Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury in Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* doi:10.1053/j.jvca.2016.03.140.
11. Mete M, **Aydemir I**, Ünsal ÜÜ, Duransoy YK, Tuğlu Mİ, Selçuki M. Neuroprotective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in mechanically injured neuroblastoma cells. *Turk J Med Sci* 2016, 46, doi:10.3906/sag-1507-187.
12. **Aydemir I**, Öztürk Ş, Kılıçaslan Sönmez P, Tuğlu Mİ. Mesenchymal stem cells in skin wound healing. *Anatomy* 2016; doi:10.2399/ana.16.043.
13. Mete M, **Aydemir I**, Unsal UU, Collu F, Vatandas G, Gurcu B, Duransoy YK, Taneli F, Tugrul MI, Selcuki M. Neuroprotective Effects of Oleocanthal, A Compound in Virgin Olive Oil, in A Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Turk Neurosurg* 2018; 28(6):858-865 doi: 10.5137/1019-5149.JTN.21417-17.2.

- 14. Aydemir I**, Kum Ş, Tuğlu Mİ. Histological investigations on thymus of male rats prenatally exposed to bisphenol A. *Chemosphere*. 2018 ;206:1-8. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.145
- 15. Aydemir I**, Vatansever S, Özbilgin K. Effects of α -lactalbumin and sulindac on primary and metastatic human colon cancer cell lines. *Turk J Biochem* 2019; 44(6): 787–796.
- 16. Ünsal ÜÜ**, Mete M, **Aydemir I**, Duransoy YK, Umur AŞ, Tuğlu Mİ. Inhibiting effect of oleocanthal on neuroblastoma cancer cell proliferation in culture. *Biotech Histochem*. 2019 Nov 6:1-9. doi: 10.1080/10520295.2019.1674919.
- 17. Yıldız M**, **Aydemir I**, Kum Ş, Eren Ü. Histological and immunohistochemical studies of the proximal caecum and caecal tonsils of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Anat Histol Embryol*. 2019 Sep;48(5):476-485. doi: 10.1111/ahe.12469.
- 18. Mete M**, Ünsal ÜÜ, **Aydemir I**, Kılıçaslan-Sönmez P, Tuğlu Mİ. Punicic Acid Inhibits Glioblastoma Migration and Proliferation via the PI3K/AKT1/mTOR Signaling Pathway. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(9):1120-1131. doi: 10.2174/1871520619666190405112507.