

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
MODELİNDE SANTRAL VE PERİFERİK NÖRON HASARINA
AMANTADİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Melda ÖZTATAR

ARALIK – 2021

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
MODELİNDE SANTRAL VE PERİFERİK NÖRON HASARINA
AMANTADİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Melda ÖZTATAR

DANIŞMAN:
Doç. Dr. Onur PALABIYIK

ARALIK - 2021

TEZ ONAYI

Kurum : Sakarya Üniversitesi/Tıp Fakültesi
Program türü : Uzmanlık Tezi
Anabilim Dalı : Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Tez Sahibi : Melda ÖZTATAR
Sınav Tarihi : **Saat:**
Tez Başlığı : Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Santral ve Periferik Nöron Hasarına Amantadinin Nöroprotektif Etkisi

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Uzmanlık Tezi olarak Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza	Kabul/Red*
Danışman (Üye)	Doç. Dr. Onur PALABIYIK		Kabul
Üye	Prof. Dr. Ali Fuat ERDEM		Kabul
Üye	Prof. Dr. Gülbin SEZEN		Kabul

* Red kararının gerekçesi onay sayfasının arkasında belirtilmelidir.

ONAY

“Bu tez 10/01/2022 tarihinde yukarıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.”

../../202..
Tıp Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05/02/2020 tarihinde onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../2021

Melda ÖZTATAR

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim ve en zorlu süreçlerden biri olan tez planlama, proje yürütme, yazma aşamalarında her zaman yanımda olan, bana bilgileri ve tecrübeleriyle hep destek olan sevgili hocam Doç. Dr. Onur PALABIYIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tıp Fakültesinde öğrencilik hayatımdan başlayarak asistanlık sürecimde de çok şey öğrendiğim, her konuda her zaman başvurduğum, hayatıma çok güzel dersler katmış anestezi ailemizde çok kıymetli olan hocam Sayın Prof. Dr. Ali Fuat ERDEM'e; eğitim sürecinde her zaman yanımda olan, hem sosyal hem mesleki hayatta desteğini hep hissettiğim canım hocam Doç. Dr. Ayça TAŞ TUNA'ya; klinik tecrübe ve bilgi birikimleriyle eğitimimize katkıda bulunun değerli hocam Doç. Dr. Onur BALABAN'a; kısa zamanda beraber olsak da çalışma hayatıma ve mesleki tecrübelerime yenilerini katarak, bilgi ve deneyimlerini paylaşan hocam Doç. Dr. Bayazıt DİKMEN'e; akademik olarak hep teşvik eden, kendimi hem kişisel hem mesleki olarak geliştirmemde büyük katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Serbülent Gökhan BEYAZ'a, özellikle yoğun bakımda geçirdiğim süreçte bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Yakup TOMAK'a ve yine kısa süre birlikte olsak da bana çok katkısı olan hep gülyüzlü hocam Prof. Dr. Ümit KARADENİZ'e en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm değerli asistan arkadaşlarım, meslektaşlarım, anestezi teknikerleri ve teknisyenleri, yoğun bakım hemşireleri ve diğer çalışanlarımıza da ayrıca teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca her anımda yanımda olan sevgili aileme; bu sürecin büyük kısmında beraber yaşayarak benimle zor günlerimi geçirmiş olan ablama, her zaman desteğini gösteren anne ve babama çok teşekkür ediyorum.

Dr. Melda ÖZTATAR

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMA VE SİMGELER.....	vi
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
RESİMLER	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İSKEMİ.....	4
2.2. REPERFÜZYON	7
2.3. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ	8
2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	10
2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)	13
2.3.3. Kompleman Sistemi ve Sitokinler	14
2.3.4. Endotel Hücresinin Rolü.....	14
2.3.5. Antioksidanlar	15
2.4. ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	15
2.5. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ NÖRAL YAPILARA ETKİSİ	16
2.6. İ-R HASARINDA N-METİL D-ASPARTAT ANTAGONİZMASI.....	18
2.7. AMANTADİN	19
2.8. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	20
2.8.1. Apolipoprotein A1 (APO A1)	20
2.8.2. Beyin Natriüretik Peptid (BNP).....	20
2.8.3. Nöron Spesifik Enolaz (NSE).....	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. DENEK SEÇİMİ.....	23
3.2. YÖNTEM.....	23
3.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	28
3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	29
3.4.1. Işık Mikroskobu Takibi.....	29
3.4.2. İmmünohistokimya Uygulaması.....	30
3.4.3. Toluidine mavisi boyama ve prosedürü	31
3.4.4. Hematoksilen-Eozin boyama ve prosedürü	32
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR	53
EKLER.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	762

KISALTMA VE SİMGELER

Ca⁺²	: Kalsiyum
O₂	: Oksijen
İ-R	: İskemi-reperfüzyon
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
Apo A1	: Apolipoprotein A1
BNP	: Beyin natriüretik peptid
NSE	: Nöron spesifik enolaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
MDA	: Malondialdehit
CAT	: Katalaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
Na⁺-K⁺ ATPaz	: Sodyum-potasyum ATPaz
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
H⁺	: Hidrojen iyonu
Na⁺	: Sodyum
Ca⁺	: Kalsiyum
NO	: Nitrik oksit
HOCl	: Hipoklorik asit
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
H₂O	: Su
O₂⁻	: Süperoksit anyon
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
IL	: İnterlökin
PMNL	: Polimorfonükleer lenfosit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

GSH	: Glutasyon
OH[·]	: Hidroksil radikali
ICAM-1	: İnterselüler adhezyon molekülü 1
i.p	: İntraperitoneal
i.v	: İntravenöz
C	: Kompleman
KDH	: Ksantin dehidrogenaz
KO	: Ksantin oksidaz
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
ET	: Endotelin
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PBS	: Fosfat tamponlu salin
IHC	: İmmünohistokimyasal

TABLULAR

Tablo 1. Bilinen bazı radikal ajanlar (Dünder 2000).....	11
Tablo 2. Serbest radikallerin kaynakları (Aksoy 2002).....	12
Tablo 3. Rat ağırlıklarının gruplara göre dağılımı.....	34
Tablo 4. Elisa Testi sonuçlarının dağılımı.....	34
Tablo 5. Histopatolojik deęişiklerin deęerlendirmeleri.....	40
Tablo 6. Histopatolojik değişiklerin Post Hoc değerlendirme Sonuçları	41



ŞEKİLLER

Şekil 1. İntrasellüler Ca^{+2} 'nin toksik etkileri (Kumar et al. 2017).....	5
Şekil 2. Doku oksijenizasyonunda azalmanın yarattığı etkiler (Mc Cance et al. 2013).....	6
Şekil 3. Hücre hasarında serbest oksijen radikallerinin yeri (Kumar et al. 2017)	8
Şekil 4. İskemi sonrası pürin metabolizması ve KDH'ın KO'ya dönüşümü, reperfüzyon sonrası oksijen radikallerinin oluşumu (Schoenberg 1993). ...	10
Şekil 5. Serbest radikal oluşumu, hücre içindeki patolojik etkileri ve hücreden temizlenmeleri (Kumar et al. 2017).	12
Şekil 6. Schwann hücre sayısındaki değişikliklerin gruplara göre dağılımı	35
Şekil 7. Akson hasarı artışının gruplara göre dağılımı	36
Şekil 8. Miyelinizasyon değerlerinin gruplara göre dağılımı	37
Şekil 9. Siyatik sinir kaspaz-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı	38
Şekil 10. Beyin korteksi kaspaz-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı.....	39

RESİMLER

Resim 1. Ratların traşlanması	24
Resim 2. Orta abdominal hat insizyonu	25
Resim 3. İnfrarenal abdominal aortaya konulan mikrovasküler klemp	26
Resim 4. Vacutainer ile kan alınması ve ötenazi	27
Resim 5. Beyin ve siyatik sinir dokusu	27
Resim 6. Grup S, A, I-R ve I-R/A'ya ait siyatik sinir hematoksilen-eozin preparatları, 200X 50 scala bar.	42
Resim 7. Grup S, Grup A, Grup I-R ve Grup I-R/A'ya ait beyin korteks bölgesi Hematoksilen-Eozin preparatları karşılaştırılması. 200X ve 50 scala bar.	43
Resim 8. Çalışma gruplarının Toluidine blue preparatları,400x büyütme 50 scala bar.	44
Resim 9. Sham, Amantadin, I-R VE I-R/A gruplarına ait siyatik sinir kaspaz-3 IHC boyanması karşılaştırılmakta. 200X büyütme 50 scala bar.	45
Resim 10. Sham, Amantadin, I-R VE I-R/A gruplarına ait beyin korteksinin kaspaz-3 IHC boyanması karşılaştırılmakta. 200X büyütme 50 scala bar.	46

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Alt ekstremitte İ-R hasarında hem iskemik kalan dokuda lokal hasar hem de iskemik kalan alanın dışındaki bölgelerde uzak organ hasarı ortaya çıkabilmektedir. Alt ekstremitte İ-R hasarı modelinin santral ve periferik sinir hücrelerine olumsuz etkilerine karşı amantadinin nöroprotektif etkisine dair bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ-R hasarının santral ve periferik sinir sistemindeki olumsuz etkilerine karşı, 45 mg/kg dozunda amantadinin koruyucu etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Etik kurul onayı alındıktan sonra 24 adet rat rastgele 6'şarlı dört gruba ayrılmıştır. İntraperitoneal yolla anestezi uygulandıktan sonra; Grup S'ye sadece orta abdominal insizyon yapıldı. Grup A'ya 45mg/kg amantadin uygulandı ve orta abdominal insizyon yapıldı. Grup I-R'ye orta abdominal insizyon sonrası infrarenal abdominal aorta klemplenerek 120 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon yapıldı. Grup I-R/A'ya amantadin verilip İ-R uygulandı. 4 saat sonunda ratlardan alınan kan, beyin ve siyatik sinir doku örnekleri biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelendi.

BULGULAR: Gruplar arasında Apolipoprotein A1, beyin natriüretik peptid ve nöron spesifik enolaz düzeyleri istatistiksel olarak benzerdi. Histopatolojik olarak Schwan hücre sayısı, akson hasarı ve miyelinizasyon hasarı değerlendirildiğinde, istatistiksel anlamlı olarak Grup I-R'de Grup S'ye göre hasarın daha fazla olduğu ve Grup I-R/A'da ise hasarın azaldığı saptandı. İmmunhistokimyasal değerlendirmede de kaspaz-3 boyanma istatistiksel olarak Grup I-R'de Grup S'ye göre fazla, Grup I-R/A da ise Grup I-R'den az olduğu görüldü.

SONUÇ: Sonuç olarak amantadin alt ekstremitte İ-R hasarının santral ve periferik sinir sistemi hücrelerine olan olumsuz etkilerine karşı nöroprotektif özellik göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarı, amantadin, immunhistokimyasal inceleme, nöroproteksiyon, rat



SUMMARY

The Neuroprotective Effect Of Amantadine On Central And Peripheral Neuronal Injury In A Model Of Lower Extremity Ischemia Reperfusion Injury

INTRODUCTION AND AIM: In lower extremity I-R injury, both local damage to the ischemic tissue and distant organ damage occur in areas outside the ischemic area. In our study, we aimed to demonstrate the protective effect of amantadine at dose of 45 mg/kg biochemically and histopathologically against the effects of lower extremity I-R damage on the central and peripheral nervous system in rats and no study has been done on this subject before.

MATERIAL AND METHOD: 24 rats divided into groups of 6. After intraperitoneal anesthesia; Mid-abdominal incision was made in Group S. Group A was administered 45mg/kg amantadine and mid-abdominal incision was made. Group I-R underwent 120 minutes ischemia - 120 minutes reperfusion by clamping the infrarenal abdominal aorta. Group I-R/A was given amantadine and I-R was applied. At the end of 4 hours, blood, brain and sciatic nerve tissue samples taken from rats were analyzed biochemically, histopathologically and immunohistochemically.

RESULTS: Apolipoprotein A1, brain natriuretic peptide and neuron-specific enolase levels were statistically similar between the groups. When the number of Schwann cells, axon damage and myelination damage were evaluated histopathologically, The damage was higher in Group I-R compared to Group S and the damage was reduced in Group I-R/A. In the immunohistochemical evaluation, caspase-3 staining was statistically higher in Group I-R than Group S, and less in Group I-R/A than Group I-R.

CONCLUSION: In conclusion, amantadine shows neuroprotective properties against the negative effects of lower extremity I-R damage on central and peripheral nervous system cells.

Key words: Amantadine, immunohistochemical analysis, lower extremity ischemia-reperfusion injury, neuroprotection, rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi; doku ve organların ihtiyaçlarının dolaşım tarafından karşılanamaması, hücre depolarının tükenmesi ve toksik maddelerin birikimiyle oluşan hasardır. İskemi sırasında doku hipokside kalır ve hipoksik hasara uğrar (Ozan E ve ark 2004). Hasarın önlenmesi için dokunun tekrar kanlanması gereklidir. Buna reperfüzyon denir. Ancak reperfüzyon sağlanması, iskemi nedeniyle oluşan doku hasarından daha fazla ve hatta daha ciddi hasara sebep olur (Zimmerman and Granger 1992, Montalvo-Jave et al 2008). Reperfüzyon ile yeniden oksijenlenen dokuda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşur. Oluşan SOR ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle lokal ve sistemik hasar oluşumu başlar (Prem et al. 1999, Klausner et al. 1989)

İskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarı; serebrovasküler enfarkt, miyokard enfarktüsü, organ transplantasyonları, hemorajik şok, trombolitik tedavi, kardiyo-pulmoner resüsitasyon yapılması gibi birçok durumda ortaya çıkmaktadır ve yüksek morbidite/mortalite ile seyrettiği bilinmektedir. Dokuya giden kan akışının ve oksijen sunumunun azalması ile başlayan hasar, dokular reperfüze olduğunda yeniden oksijenasyon sağlanması ile artarak devam eder.

İskemi reperfüzyon hasarında hem iskemik kalan dokuda (lokal hasar) hem de iskemik dokunun dışındaki bölgelerde (uzak organ hasarı) hasar olabilmektedir. Uzak organ hasarına neden olan mediyatörler direkt olarak iskemik dokudan kaynaklanabileceği gibi dolaşımdaki aktive lökositler ve inflamatuvar mediyatörlerden de kaynaklanabilir.

İskemi-reperfüzyon hasarının çeşitli doku ve organlar üzerinde meydana getirdiği etkiler ortaya konulmuştur. Alt ekstremitte İ-R hasarı oluşturulan ratlarda akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve ince barsaklarda uzak organ hasarının olduğu birçok çalışma mevcuttur (Kao et al. 2011, Chang et al. 2016, Gokalp ve ark. 2020,

Ozdemir ve ark. 2021). Hipoksi veya iskemi nedenli oluşan beyin hasarında glutamat ve diğer aktivatörlerin N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı uyarımının neden olduğu düşünülmektedir. NMDA antagonistlerinin, antioksidan aktiviteyi arttırarak ve oksidan etkiyi azaltarak İ-R hasarına karşı koruyucu etki gösterdikleri bilinmektedir (Camara-Lemarroy et al. 2009, Özdemir ve ark. 2013, Özsüer ve ark. 2005). NMDA reseptör antagonisti olan memantin ve ketaminin İ-R hasarı sonrasında çeşitli dokularda oluşan hasara karşı koruyucu olduğu gözlenmiştir (Himmelseher and Durieux 2005, Lee et al. 2004, Kato and Foex 2002). Esasen günümüzde antiviral ajan olarak kullanılan amantadin de memantin ve ketamin gibi NMDA reseptörleri üzerine antagonist etkiye sahiptir. Deneysel ve klinik çalışmalarda amantadinin travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkileri kanıtlanmıştır (Meythaler et al. 2002, Wang et al. 2014, Okigbo et al. 2019, Gao et al. 2020). Bununla birlikte, amantadinin İ-R hasarının doku ve organlardaki olumsuz etkilerine karşı koruyuculuğunun gösterildiği çalışma sınırlı sayıdadır (Orhan ve ark. 2021). Alt ekstremitte İ-R hasarı modelinin santral ve periferik sinir sistemdeki nöronlar üzerinde meydana getirdiği değişikliklere karşı amantadin kullanımının nöroprotektif etkisine dair bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamızda bu amaca yönelik olarak, ratlarda oluşturulan alt ekstremitte İ-R hasarının santral ve periferik sinir sistemindeki nöronlarda görülen olumsuz etkilerine karşı, 45 mg/kg amantadinin koruyucu etkisinin biyokimyasal parametlerle ve histopatolojik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Ratlardan alınan kan örneklerinin biyokimyasal değerlendirmesinde rat apolipoprotein A1, beyin natriüretik peptid, nöron spesifik enolaz seviyeleri, BT LAB (Bioassay Technology Laboratory, Zhejiang, China) marka ticari ELISA kiti kullanılarak enzim bağlı immünoabsorbent yöntemi ile çalışıldı.

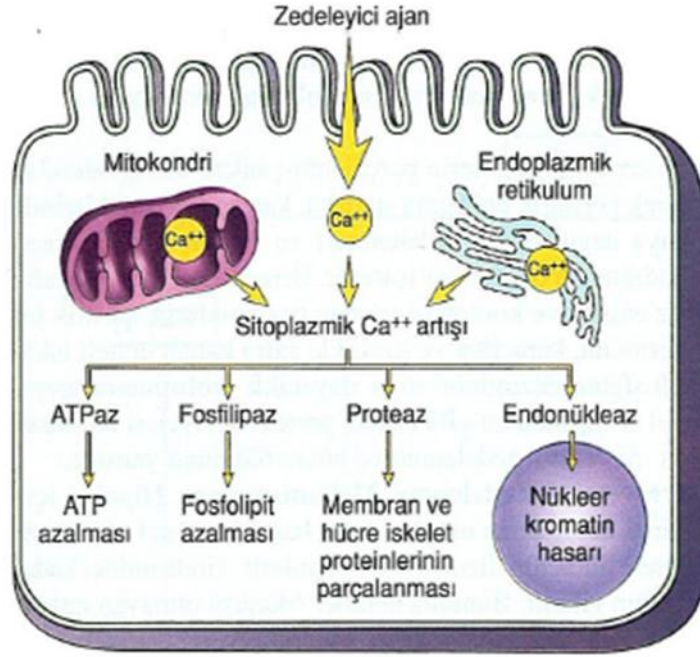
Histopatolojik incelemede doku örnekleri hematoksilin-eozin ve toluidine mavisi boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi. kaspaz-3 işaretlenerek immünohistokimya çalışması yapıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İSKEMİ

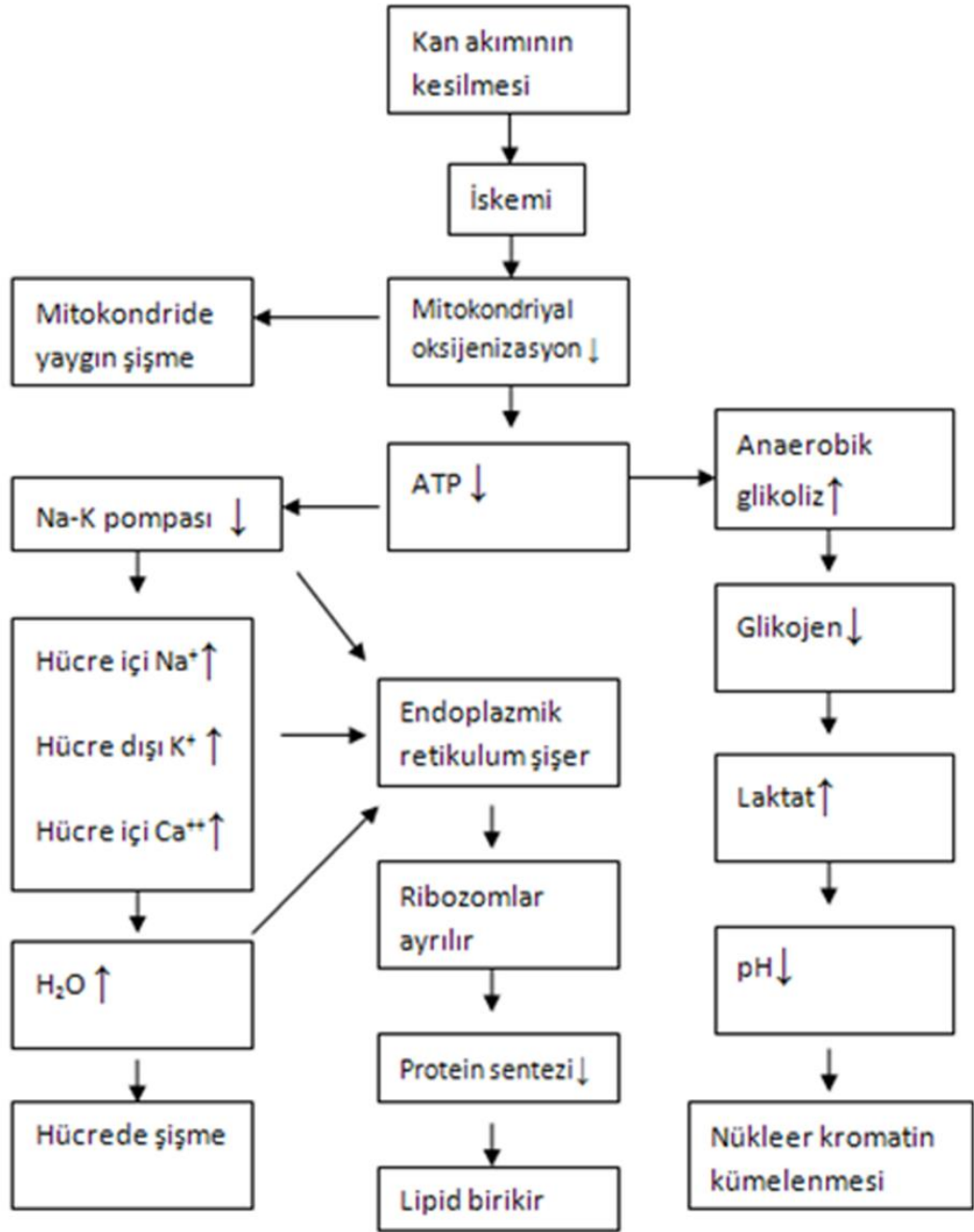
Organ ve dokulara giden kan akımının arteryal, venöz veya her ikisinin birlikte azalması ya da tamamen kesilmesiyle yetersiz perfüzyonu sonucu oksijensiz kalması iske mi olarak tanımlanır (Jennings and Reimer 1991). İske mi sonucunda hücrelerin enerji deposu tükenir ve bunun sonucunda iskemik kaskat denilen olay zincirleri başlar. Hipoksik kalan hücrede, oksidatif fosforilasyon ve mitokondrial elektron transport kapasitesi giderek azalmaktadır. Adenozin trifosfat (ATP) sentezi durur ama buna rağmen ATP kullanımı ve ATP hidrolizi devam ettiği için oluşan adenozin difosfat (ADP) düzeyi artmaya devam eder (Zimmerman and Granger 1992, Grace 1994). Enerji eksikliği olduğunda doğrudan veya dolaylı bir şekilde hücrenin iyon dengesi bozular, bunun sonucunda hidrolazlar aktive olarak yıkım başlatır ve hücre zarı geçirgenliği de artar. Bu değişiklikler sırayla meydana gelir. Hipoksik dönem ne kadar uzunsa değişiklikler de o kadar fazla olur. Glikolitik hızda ve ATP tüketimindeki artışın sonucunda zarar gören lizozomlardan hidrojen iyonu (H^+) serbestleşmesi nedeniyle sitozolik pH doğrudan azalır. Bu olaylarla birlikte hücre içi iyon dengesi de bozular. Sitozolik kalsiyum (Ca^{+2}) ve sodyum (Na^+) konsantrasyonları artar ve sodyum-potasyum ATPaz (Na-K ATPaz) pompası inhibe olur. Ca^{+2} konsantrasyonunun hücre içindeki bu artışı hidrolazları aktive eder (Şekil-1) (Kumar et al. 2017).



Şekil 1. İntrasellüler Ca^{+2} 'nin toksik etkileri (Kumar et al. 2017)

Na^+ osmotik basıncı arttırarak hücre içine su çeker ve hücrenin şişmesine sebep olur (Chan et al. 2018). İskemi sırasında ATP üretimi olmadığı halde tüketimi devam ettiğinden adenzin monofosfat (AMP) ve adenzin oluşumu da devam eder. Adenzin, hücre dışına hızla difüze olur ve parçalanarak inozin ve hipoksantini oluşturur. Sonuçta, iskemi sırasında yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı ile pürin metabolitleri (örn: ksantin, hipoksantin) dokuda birikir. Bu ise ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar.

Normal süreçte hipoksantin ürik aside yıkılır ve burada elektron alıcısı nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'tir. Ancak iskemi durumunda KDH, KO'ya dönüştüğü için hipoksantin ürik aside yıkımı KO tarafından gerçekleştirilir ve bu tepkimeye elektron alıcısı moleküler O_2 'dir (Parks et al. 1988). Bu olayların sonucunda hipoksantin dokuda yüksek seviyelere çıkar. Reperfüzyonla dokuya tekrar oksijen ulaştığında fazla miktardaki hipoksantin, KO ile tepkimeye girmesi toksik serbest radikal oluşumuna neden olur (Toyokuni 1999). İskeminin geçmesine rağmen kalıcı mitokondri fonksiyon kaybı ve hücre membran fonksiyonlarının ileri seviyede bozulması irreversibl hasar göstergesi olduğu bilinmektedir. (Hensley et al. 2000, Droge 2002) (Şekil 2).



Şekil 2. Doku oksijenizasyonunda azalmanın yarattığı etkiler (Mc Cance et al. 2013)

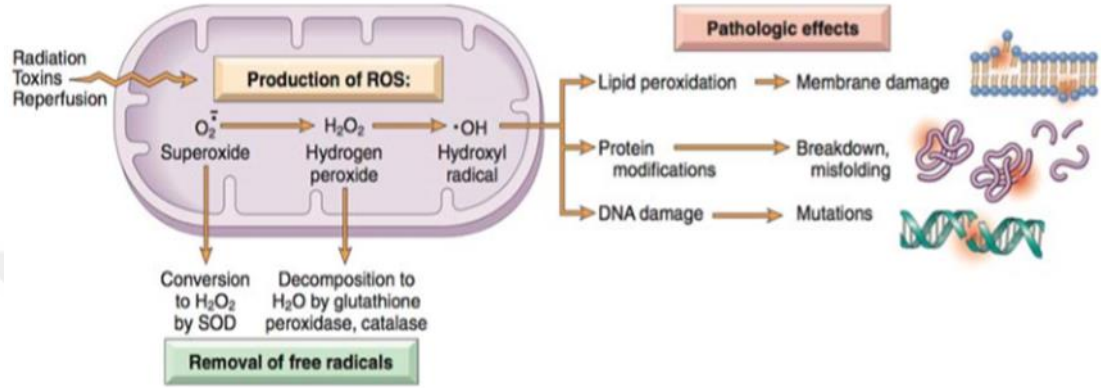
Dokuların iskemiye dayanıklılığı ve kritik iskemi süreleri birbirlerinden farklıdır. İskelet kasları (çizgili kaslar) iskemiye uzun süre dayanabilirken sinir hücrelerinde ise dakikalar içinde geri dönüşü olmayan hasar başlayabilir (Grace 1994, Semenza 2000, Girotti 1998). Kemik ve deri dokuları iskemiye, iskelet kaslarına göre daha dayanıklıdır. Dokunun iskemiye dayanabildiği ve canlılığını koruyabildiği maksimum süre kritik iskemi süresi olarak adlandırılır. Kritik iskemi süresi sıcaklığa,

dokuya ve organa bağlı olarak değişiklik gösterir (Gillani et al. 2012). Yaklaşık olarak kritik iskemi süreleri; karaciğer ve böbrek için 10-15 dk, beyin dokusunda yaklaşık 5dk ve iskelet kasında 2,5 saat civarındadır. İskemi süresinin uzaması büyük nöron hasarlarına ve enfarktüse sebep olabilir. Kritik iskemi süresinin aşılması sonrasında gerçekleşen reperfüzyon, parankimal hasarla sonuçlanmaktadır (Tapuria et al. 2008).

2.2. REPERFÜZYON

Organ veya dokuda bozulan kanlanmanın normal hale dönmesi reperfüzyon olarak tanımlanır (Carden and Grander 2000). Ancak, iskemik kalan dokunun yeniden kanlanması durumunda dokuda yalnızca iskelemlle oluşan hasara oranla daha ciddi bir hasarla sonuçlanır (Zimmerman and Granger 1992). Reperfüzyonun olumlu etkileri iskelemlle maruz kalan dokuda enerji ihtiyacının tekrar karşılanması ve toksik metabolitlerin dokudan uzaklaştırılmasıdır. İskemik hasarın ortadan kaldırılması için reperfüzyon gereklidir. İskemi kısa süreli ise reperfüzyonun hasar şiddeti hafif olurken, uzun süren iskemi durumunda geri dönüşsüz hasar başladıysa reperfüzyon hücrelerin kurtarılması için yeterli olmayabilir (Ladipo et al, 2003). Reperfüzyonun başlamasıyla birlikte inflamatuvar yanıt da başlar. Bu inflamasyon sürecinde lenfositler, makrofajlar, trombositler, nötrofiller, endotel hücreleri, parankimal hücreler ve kompleman sistemi, koagülasyon kaskadı, nitrik oksit (NO), reaktif oksijen radikalleri ve sitokinler olaya dahil olarak mikroperfüzyonu bozar (Buja 2010, Jaeschke 2003). Bu süreçte meydana gelen serbest radikaller sistemik dolaşıma karışarak çoklu organ hasarına sebep olur (Zhao et al. 2008, İnan ve ark. 2013). Oluşan hasar geri dönüşebilir düzeyde ise enerji depoları doldurularak ve hücrel dejenerasyon düzeltilerek homeostazis sağlanır. Ancak iskeminin neden olduğundan çok hasara neden olarak, reperfüzyonun kendisi de geri dönüşsüz hasara neden olabilir (Collard and Gelman 2001). İskemiden sonra, dokudaki serbest radikallerin en büyük kaynağı KO'dur (Grace 1994, Terzi ve ark. 2000). Reperfüzyon başlayınca dokuya çok miktarda O₂ molekölü gelir. Sitolitik Ca⁺² iyonu artar ve bununla birlikte KDH enzimi KO'ya dönüşür. KDH enzimi indirgeyici ajan olarak FAD kullanır ve hipoksantini ksantine çevirir. Daha sonrasında ise

ksantini ürik aside çevirir. Ve böylece KO₂'den süperoksit iyonu (O₂⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşmasına sebep olur (Orrenius et al. 1996, Salvemini and Cuzzocrea 2002). Proteinler, zar lipidleri, nükleik ve deoksiribonükleik asitler reperfüzyon hasarından en çok etkilenen yapılardır (Wilhelm 1990) (Şekil 3).



Şekil 3. Hücre hasarında serbest oksijen radikallerinin yeri (Kumar et al. 2017)

2.3. İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ

Dokuda iskemi başlamasıyla oksijen açığı olduğu için aerobik metabolizma anaerobik metabolizmaya dönüşerek işlevsel bozulmaya neden olur. Aerobik metabolizma olmadığı için dokuda ATP rezervleri tükenmeye başlar. Yeni ATP üretimi de hücreye yetersiz kaldığı için enerji gerektiren metabolizma olayları devam edemez (Dick et al. 2008, Bilal ve Sarıoğlu 1992). Aerobik glikolizde 38 ATP, anerobik glikolizde ise sadece 2 ATP üretildiği için hipoksi durumunda hücrede büyük bir ATP açığı meydana gelir. İskeminin başlangıcında glikolitik yol aşırı uyarılır. İskemik dokudaki O₂ glikolizin devamında gerçekleşecek olan oksidatif fosforilasyon için yeterli olmaz. Bu sebeple glikolizin son ürünü olarak oluşan piruvat laktata dönüşür. Devamında ortamda sitrat, laktat ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) konsantrasyonlarının artması ve doku pH'sının düşmesi ile durur.

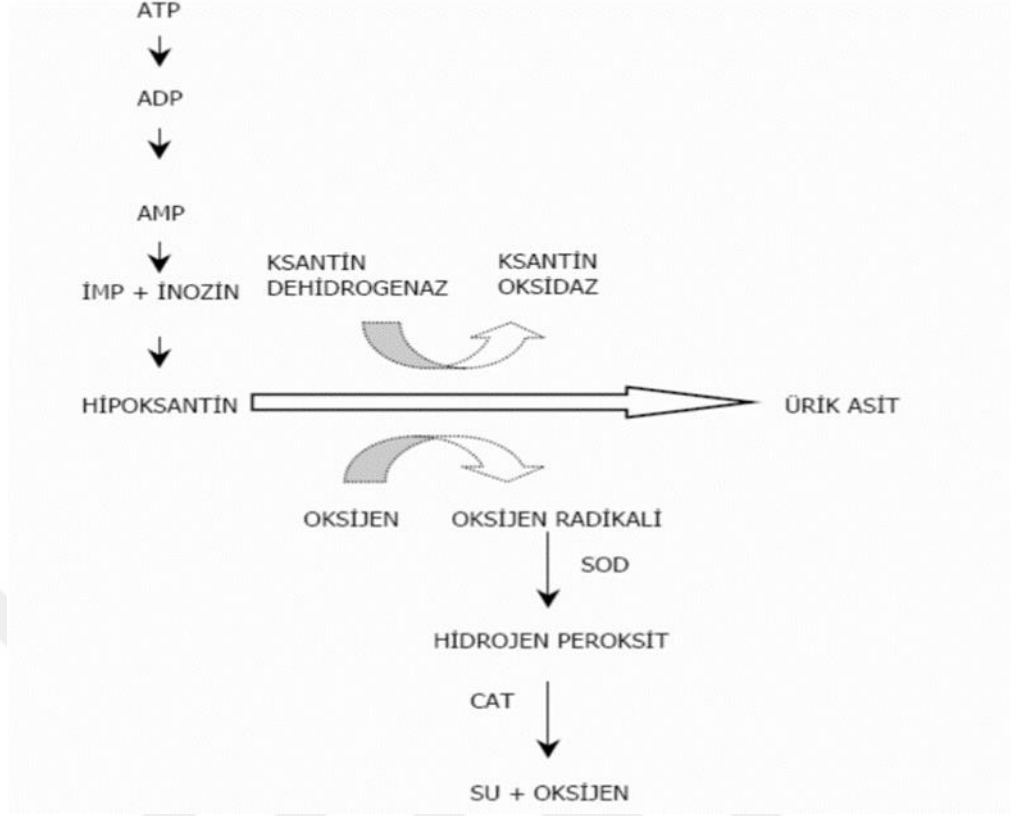
ATP eksikliği hücre içinde birbiriyle ilişkili olan çok sayıda sistemi etkiler :

Na-K ATPaz pompa fonksiyonunun bozulması: Normal şartlarda 3 Na⁺ dışarı 2 K⁺ içeri geçişini yapan bu pompa ATP bağımlı olarak çalıştığı için ortamdaki ATP eksikliği durumunda fonksiyon gösteremez ve intraselüler Na⁺ artışı ile hücre dışına K⁺ kaçışının başlamasına neden olur. Hücre içi Na⁺ artışına izoozmotik basınçla birlikte su difüzyonu eşlik eder. Bunun sonucunda hücre şişer (Kumar et al. 2000).

pH'nın düşmesi ve intraselüler asidoz: Doku O₂ düzeylerindeki azalma ile glikolizin son ürünü olan piruvat birikir ve oksidatif fosforilasyona ilerleyemediği için laktata dönüşür. Böylece doku pH'sı düşer.

Hücre içinde Ca⁺² birikimi: Hipoksi veya toksinler Ca⁺² seviyelerinde artışa neden olur. Bu artışın başlıca sebepleri endoplazmik retikulumdan ve mitokondriden Ca⁺² salınımı ve hücre zarından Ca⁺² geçişidir. Artmış Ca⁺² seviyesi çok sayıda enzimin aktive olmasına neden olur. Bunlar; fosfolipazlar (membran hasarı yapar), proteazlar (membranları ve hücre iskeletini oluşturan proteinlerini parçalar), ATPaz ve endonükleaz (kromatinin parçalanmasına neden olur)'dır (Yıldar 2008).

Pürin metabolitlerinin birikmesi: Hücre içindeki ATP'nin yıkılması ile oluşan ADP'ler; önce AMP'ye yıkılarak sonrasında sırası ile adenosin, inozin ve hipoksantine dönüşür. Eğer reperfüzyon sağlanır ise hipoksantin O₂ ve KO enziminin etkisiyle ksantine dönüşür. Ksantin de ortamdaki O₂ ile tepkimeye girer ve ürik asite parçalanır. Bu olayların sonucunda hasardan sorumlu olan süperoksit radikalleri oluşur. Hipoksinin devamlılığı halinde ortamda O₂ kalmadığı için ksantin, NAD ve hidrojen ile tepkimeye girerek ürik asit, NAD-fosfat, H⁺, H₂O₂ ve süperoksit radikalleri (O₂⁻) oluşturur (Dick et al. 2008) (Şekil 4).



Şekil 4. İskemi sonrası purin metabolizması ve KDH'nin KO'ya dönüşümü, reperfüzyon sonrası oksijen radikallerinin oluşumu (Schoenberg 1993).

2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Serbest radikal, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan atom ya da moleküllerdir (Altan ve ark. 2006). Aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonunda ara ürün olarak ve oksijenin redüksiyona uğraması ile negatif yüklü O_2^- iyonu oluşur. Spontan dismutasyonla veya süperoksit radikalinin enzimatik olarak tepkimeye girmesiyle de ikinci ara ürün olan H_2O_2 oluşur. Daha sonra, özellikle mitokondride olmak üzere hidroksil radikali (OH^-) oluşur. Hücre içinde bu serbest radikaller dışında radikal olmayan ama serbest radikal oluşturma potansiyeli olan; H_2O_2 , hipoklorik asit gibi zararlı oksijen türleri de oluşabilir. Diğerleriyle karşılaştırıldığında O_2 radikalleri çok reaktif ürünlerdir ve yüksek elektron aktiviteleri vardır. Aralarında en aktif olanı OH^- radikalidir (Grace 1994, Ertan ve ark. 2001). Organizmada, oksidan ürünlere maruziyeti en aza indirmek için antioksidanlar mevcuttur, ancak serbest oksijen radikallerinin yüksek seviyelere ulaştığı

durumlarda, antioksidanlar yetersiz kalır ve oksidatif hasar gerçekleşir (Cantürk ve Sayek 2005).

Tablo 1. Bilinen bazı radikal ajanlar (Dündar 2000).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H^{\cdot}	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH^{\cdot}	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Moeküler hasar yeteneği zayıf, reaktivitesi çok düşük
Singlet oksijen	O_2^-	Güçlü oksidatif oksijen formu, yarılanma ömrü hızlı
Perhidroksi radikal	HO_2^{\cdot}	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO^{\cdot}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl_3	CCl_4 metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS^{\cdot}	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO^{\cdot}	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L- arjinin amino asitinden in vivo üretilir.
Nitrojen dioksit	NO_2	NO 'in oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşur

Serbest radikal ajanlar endojen veya eksojen kaynaklı olarak oluşabilirler (Aksoy 2002) (Tablo 2).

Tablo 2. Serbest radikallerin kaynakları (Aksoy 2002).

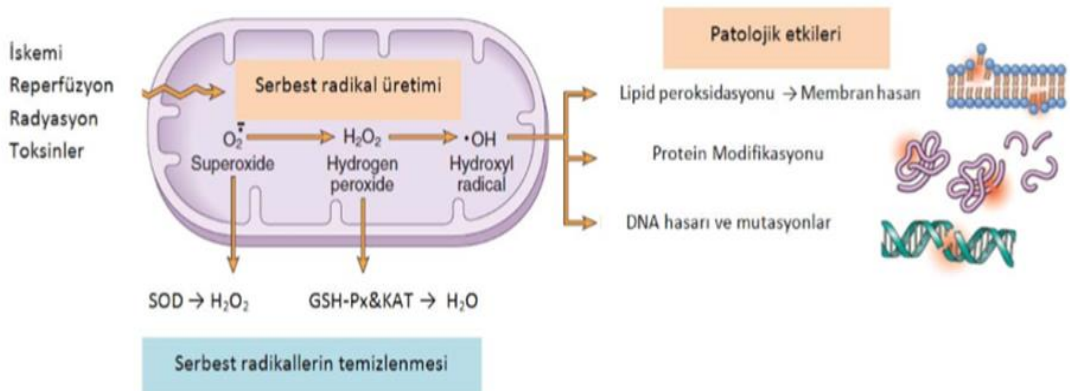
Endojen Kaynaklar

Oksidan enzimler
Mitokondriyal elektron transport zinciri
Galaktoz oksidaz
Siklooksijenaz
Mikrozomal elektron transport zinciri
Monoamin oksidaz
Nötrofiller
Lipoksijenaz
Indolamin dioksijenaz
Monositler ve makrofajlar
Eozinofiller
Ksantin oksidaz
Endotelial hücreler
Fagositik hücreler
Otoksidasyon reaksiyonları (ör, Fe^{+2})

Eksojen Kaynaklar

Okside glutatyon
Redoks siklus bileşikleri (ör, paraquat, doksorubisin)
Sigara
Güneş ışığı
İlaç oksidasyonları (ör, parasetamol)
Isı şoku

Bu serbest radikaller, membranlarda bulunan lipidlerini perokside ederek, mitokondri hasarına sebep olur, hücre proteinlerine ve genetik materyale hasar verir (Rodwel et al. 2015) (Şekil 5).



Şekil 5. Serbest radikal oluşumu, hücre içindeki patolojik etkileri ve hücreden temizlenmeleri (Kumar et al. 2017).

Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu: SOR proteinlerin sülfhidril gruplarıyla etkileşime geçerek çapraz bağlanmalarını artırırlar. Bu da protein yapıdaki enzimlerin yapılarının bozulmasına veya etkinliklerinin azalmasına sebep olur. Ayrıca, serbest radikaller polipeptidlerin doğrudan parçalanmasına da neden olabilirler.

Lipid Peroksidasyonu: SOR, hücre membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonuna sebep olurlar. OH radikalının, membran lipitleriyle zincirleme reaksiyonu sonucunda farklı lipid peroksidasyon ürünleri oluşur.

DNA fragmantasyonu: Serbest radikallerin timin nükleotidleri ile reaksiyonu sonucu çekirdek veya mitokondride bulunan DNA yapısında tek zincir kırılmalarına sebep olur (Kumar et al. 2007).

2.3.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

İskemi-reperfüzyon hasarından sonra aktiflenen ilk hücreler PMNL olup, mikrovasküler permeabilite artışından da başlıca sorumlu olduğu düşünülen hücrelerdir (Serizawa et al. 1996, Kumar et al. 2007). Antinötrofil serumlarla ya da monoklonal antikorlar ile yapılan çalışmalar, reperfüzyondaki mikrovasküler permeabilite artışına başlıca nötrofillerin sebep olduğunu göstermiştir (Lopez-Neblina et al. 1996). PMNL'in İ-R hasarındaki rolüyle ilgili olarak mikrovasküler oklüzyon, sitotoksik enzimlerin salınması, vasküler permeabilitede artış ve sitokin salınımında artış gibi mekanizmalar olabileceği söylenmiştir (Eltzschig and Collard 2004).

Hasar yaratan etkeni ortadan kaldırmak veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik olan bu inflamatuvar yanıtların sonucunda; mikrovasküler permeabilitede artış, tromboz, ödem ve hücre ölümü gerçekleşir. Görevlerini tamamlayan PMNL apoptotik hücre ölümüne uğramaları sonucu makrofajlar aracılığı ile lenfatik dolaşıma katılır ve ortamdan uzaklaştırılırlar (Schoenberg and Beger 1993).

2.3.3. Kompleman Sistemi ve Sitokinler

Kompleman (C) sistemi inflamasyonda ve konakçı savunmasında önemli görevleri olan plazma proteinleridir. C proteinleri aktive olarak, zararlı partiküllerin üzerine kaplayarak (opsonize ederek) fagosite edilmelerini sağlarlar. Vasküler permeabiliteyi ve lökosit kemotaksisini artırır. Bu şekilde inflamatuvar yanıtı artırır (Kumar et al. 2007). C proteinlerinden C3a ve C5a anaflatoksinlerdir. C5a proteini lökosit aktivasyonu yapar ve kemotaksisi uyarır. Bunlara ek olarak; makrofaj inflamatuvar proteinleri, MCP-1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı artırır (Thrane et al. 2007). C5b9 proteini de endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 üretimini uyararak lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi artırır. Bununla beraber endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe eder. Endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (Suzuki et al. 1991, Zhang et al. 1999). Reperfüzyon sırasında miyokarda C aktivasyonunu gösteren bir çalışmada C sistemi C1 inhibitörü kullanılarak klasik yoldan inhibe edilmiş ve böylece iskemik kalan miyokardın reperfüzyon hasarından efektif bir şekilde korunduğu gözlenmiştir (Buerke et al. 1995).

2.3.4. Endotel Hücresinin Rolü

Endotel hücreler oksidatif strese maruz kaldığında aktivasyon ve işlev bozukluğuna uğrarlar. Endotel hücreleri hem kendileri SOR üretirler hem de SOR'un potansiyel hedefidirler. Endotel hücreleri, mikrovasküler homeostazdan sorumlu moleküller olan endotelin (ET) ve NO'yu üretirler. Arter üzerinde ET'in vazokonstriktör etkisi varken NO ise vasodilatasyon etkisine sahiptir. Venler üzerinde ise arterlerin tersi bir etkisi vardır. İ-R hasar durumunda ET/NO oranı ET lehinde bozulur. Sonuç olarak arteriyel vazokonstriksiyon ve venöz vazodilatasyon olur (Oğuz 2010). Oksidatif stres altında kalan endotel hücreleri C sistemini aktifler ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artmaya başlar. Bunlara ek olarak aktive olan endotel hücreleri kollajenaz salgılayarak kendi bazal membranlarının sindirimine de neden olabilirler (Weight et al. 1996).

2.3.5. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin vücuttaki olumsuz etkilerini önlemek için oluşturulan savunma sistemleridir (Dick et al. 2008) Bu sistemler lokal O₂ konsantrasyonunu azaltarak, lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, hidroksil radikallerini temizleyerek, metal iyonlarını bağlayarak ve zincir reaksiyonlara neden olabilen radikallerle reaksiyona girip bu reaksiyonların kırılmasını sağlayarak antioksidan etki gösterebilirler. Antioksidanların en belirgin özelliklerinden biri çok az konsantrasyonda bulunsalar bile, okside olan substratın oksidasyonunu geciktirebilmeleri ve inhibe edebilmeleridir (Halliwell and Gutteridge 1990). Oksidan maddeler belirli bir düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın enfeksiyon ajanlarına ve yabancı maddelere karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak bu düzeyin üzerinde oluşurlarsa veya antioksidan sistem yetersiz kalırsa; serbest radikal molekülleri, organizmanın yapısını oluşturan proteinleri, lipitleri, karbonhidratları, nükleik asitleri ve enzimleri bozarak yıkıcı etkilere yol açarlar (Yalçın 1998). Antioksidan moleküller heterojen bir ailedir. Kökeni (doğal ya da sentetik), özellikleri (hidrofilik ya da lipofilik), doğası (enzimatik ya da nonenzimatik), mekanizması (metal şelasyon, reaktif oksijen moleküllerinin yıkılarak olarak ortadan kaldırılması) ve etki alanı (hücre içi, hücre dışı ve hücre zarı) dikkate alınarak çeşitli gruplandırmalar yapılmıştır (Glatzounis et al. 2005).

2.4. ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Alt ekstremitte akut İ-R hasarı, özellikle aort cerrahilerinde abdominal aortaya geçici süre ile kros-klemp konulması sırasında ve akut femoral arter trombozlarında ortaya çıktığı görülmektedir (Yardım Akaydın S. ve ark. 2006, Carden and Granger 2000). Akut gelişen alt ekstremitte İ-R hasarının sonucunda lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt olur ve buna bağlı olarak plazmada artan proinflamatuvar ajanlar artar. Bu ajanlarla birlikte SOR ve nötrofil infiltrasyonu olması uzak organ hasarının oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. (Nakamura et al. 2001). Alt ekstremitte İ-R hasarı akciğer, karaciğer, bağırsak, kalp ve ince barsak gibi uzak organları içerecek şekilde bir hasar meydana getirir ve hatta multiple organ yetmezliğine neden

olabildiği bilinmektedir. (Chang et al. 2016, Gokalp ve ark. 2020, Ozdemirkan ve ark. 2021).

2.5. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ NÖRAL YAPILARA ETKİSİ

Vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturan beyin dokusunun inspire edilen oksijenin yaklaşık olarak %20'sine, kardiyak debinin yaklaşık %15'ine, açlık durumunda karaciğerden salınan glukozun tamamına ihtiyacı vardır. Normal şartlarda kortekste gri cevher 6ml/100gr/dak, beyaz cevher ise 2ml./100gr/dak kadar oksijen harcar. Beyin dokusunda glukoz tüketimi yaklaşık olarak 4.5-7mg/100gr civarındadır. Dinlenme halinde serebral dokuda kan akımı 50ml/100gr beyin dokusu/dk civarındadır (Siesjo 1992). Oksijen ve hayati ihtiyaçları karşılamak için serebral dokunun yüksek bir perfüzyon gereksinimi vardır. Beyin parankiminin anaerobik metabolizma kapasitesi ve glikojen depoları çok kısa süreli yetecek düzeydedir; bu nedenle de beyin dokusu iskemiyeye karşı fazla duyarlıdır (Ginsberg 2003, Kirino et al. 1985). İskemiye bağlı oluşan hasarda en önemli faktör yeterli miktarda enerjinin sağlanamamasıdır. Normal şartlarda serebral dokunun enerji ihtiyacı aerobik ve anaerobik glikoliz sonucunda oluşan ATP ile sağlanır. Hipoksi durumunda mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile birlikte elektron transportu bozulur ve bu sebeple ATP sentezi de durur. ATP sentezinin durması sonucunda asidoz ve makromolekül sentezinde aksaklık olur. İyon dengesi bozulur ve ATP yıkım ürünleri birikmeye başlar. İskemik hasarın başlangıcında hipoksiyle birlikte kısa bir süre anaerobik glikoliz yapılır. Ama iske mi başlangıcından yaklaşık 2-3 dakika kadar sonra beyin dokusunda laktat seviyesi maksimuma çıkar. Anaerobik metabolizma sonucu oluşan laktat ve hidrojen iyonu birikimiyle hücre içi ve dışı ortamlarda asidoz gelişir (Siesjo 1992). pH düşmesi ile birlikte proteinlerde denatürasyon başlar ve enzimatik moleküllerde fonksiyon kaybı olur. Serbest radikaller oluşmaya başlar (Siesjo et al. 1995). Nöronların hücre sel iyon dengesi hücre membranında bulunan transport kanalları ile potasyumun intraselüler ve sodyum, kalsiyum, klorun ekstraselüler gradientleri ile sağlanır. İyon dengesini sağlayan bu pompalar ATP bağımlıdır. ATP eksikliğinde iyon pompaları fonksiyon gösteremez. Bunun sonucunda da konsantrasyon farkı nedeniyle potasyum hücre

dışına çıkarken sodyum, kalsiyum ve klor hücre içine geçer. Hücre içine iyonlarla birlikte su molekülü de girdiği için hücre şişer ve “sitotoksik ödem” meydana gelir (Meyer et al 1986, Selman et al, 1990). İskemiye bağlı hasar oluşumunda; ekstraselüler alandan hücre içine kalsiyum girişi, intraselüler depolardan kalsiyum salınımı ve intraselüler kalsiyum düzeyini kontrol eden mekanizmalardaki bozulma en önemli faktörlerdendir. ATP eksikliği nedeniyle Na/K ATPaz pompası, 3Na/Ca ve Na/H transport pompaları fonksiyonunu kaybeder. İntraselüler artan Na iyon konsantrasyonu nedeniyle de N tipi voltaj duyarlı Ca⁺² kanalları açılarak hücre içine Ca⁺² geçişi olur. Presinaptik uçtan hücre içine giren Ca⁺², sinaptik aralığa başta glutamat olmak üzere eksitator aminoasitlerin salınmasına sebep olur (Siesjo 1992, Schwartz-Bloom and Sah 2001). Eksitator aminoasitlerin geri alınımı 2Na⁺/glutamat kotransporterleri ile olur. Bu pompa sodyum düzeyine ve membran potansiyeline bağlı olarak çalışır. (Siesjo and Danbolt 2001). İntraselüler Ca⁺² seviyesinin artmasıyla degradasyondan sorumlu enzimler aktive olur ve böylece lipoliz, proteoliz ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı başlar (Siesjo 1995). Ca⁺² yüksekliği ile aktive olan fosfolipaz; hücre ve organel membranlarındaki fosfolipidleri parçalayarak serbest yağ asidi oluşumuna sebep olur. İskemik hücre membranında protein ve lipit oranı bozulduğu için hücre içine daha fazla kalsiyum girişi olur. Lipoliz ile oluşan serbest yağ asitleri hem iskemi hem de reperfüzyon evresinde serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır (Schmidley 1990, Garcia and Anderson 1989). İntraselüler kalsiyum artışı sonucunda ksantin oksidaz, lizozomal ve nötral proteazların aktivasyonu başlar. Bu enzimlerin aktivasyonları hücre iskeletini oluşturan proteinlerin yıkımına, sonuçta geri dönüşü olmayan bir hücre hasarına neden olur. (Schmidley 1990, Garcia and Anderson 1989, Seyfried et al 1997). İ-R sonucunda meydana gelen doku hasarında; reperfüze olan dokuda biriken nötrofillerin aktif rol oynadığı gösterilmiştir. Nötrofil kemotaksisinin başlatılmasında lipid peroksitleri ve SOR'un rol oynamaktadır (Crack and Taylor 2005). SOR (başlıca süperoksit, hidroksil radikali, H₂O₂) moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda oluşur. Süperoksit radikali stabil bir yapıda değildir ve tepkimeye girerek zayıf etkili bir oksidan olan hidrojen peroksite dönüşür. H₂O₂, CAT enzimi tarafından indirgenir ve bu sebeple de reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Hidroksil radikalının ise doku hasarını başlatan madde olduğu bilinmektedir. Normal

şartlarda SOR, mitokondri membranına bağlı olarak bulunmaktadır ve minimal düzeyde artışları bile hücre için toksiktir. Reperfüzyonla birlikte artan SOR hücre içinde DNA, proteinler ve poliansature yağ asitleriyle reaksiyona girer. Sonuçta da hücre zarında lipid peroksidasyonu olur (Crack and Taylor 2005). Lipid peroksidasyonu sırasında karbon bağları koparak aldehid yapıda yıkım ürünleri meydana gelir. SOR ne kadar artarsa bu aldehid yapıda yıkım ürünleri de (4-hidroksi nonenol ve MDA) o oranda artar. Oluşan lipid peroksidler dokuda nötrofil artışına yol açarak indirekt hasarı da tetiklerler (Liao et al 2001). Aktive olan nötrofiller elastaz, jelatinaz, kollajenaz gibi yıkım enzimleri salgırlar ve endotel hücrelerinin bütünlüğü böylece bozulmuş olur. Vasküler yapıda endotel bütünlüğünün bozulması iskemi-reperfüzyon hasarındaki en önemli olaylardan biridir. Endotel bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte ortaya çıkan sitotoksik maddelerle mikrovasküler geçirgenlik artar. Mikrovasküler geçirgenliğin artması sonucunda interstisiyel alana sıvı geçer. Sonuçta interstisiyel ödem ve bununla beraber hemokonsantrasyon meydana gelir. Bunun sonucunda kapiller lümen iyice daralarak doku perfüzyonu bozulur (Liao et al 2001, Lopez-Neblina et al 2005).

2.6. İ-R HASARINDA N-METİL D-ASPARTAT ANTAGONİZMASI

N-Metil D-Aspartat kanallarının aktive olması ile hücre içi Ca^{+2} artar. Hücre içi Ca^{+2} birikimi sonucunda da nitrik oksit sentaz (NOS) yolu aktive olarak NO oluşur. Bu olaylar dizisinin sonucunda SOR oluşumu artar. NMDA reseptörlerinin aşırı aktive olması da apoptozise sebep olan olayları başlatmaya yol açar (Faden et al. 1990, Faden et al. 1988).

NMDA antagonistlerinin İ-R hasarına uğrayan beyin, böbrek, iskelet kası ve miyokard gibi organ ve dokularda koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Himmelseher and Durieux 2005, Lee et al. 2004, Kato and Foex 2002). Anoksik ve hipoksik nöronal hücre kültürü çalışmalarında sinaptik aralığa salınan eksitatör aminoasitlerin nörotoksik seviyelere ulaşabildiği saptanmıştır. Bu sebeple oluşan hasarın kompetitif ve nonkompetitif NMDA antagonist ajanlar ile azaltılabildiği gözlenmiştir. (Boast et al. 1988, Happel et al. 1981). Alzheimer tedavisinde

kullanılan memantin bir NMDA antagonistidir. NMDA reseptörlerinde blokaj oluşturarak yüksek glutamat düzeylerinin neden olarak intraselüler Ca^{+2} birikimini azaltır ve bu sayede tedavide etkinlik gösterir (Sonkusare et al. 2005). Anestezi ajanları arasında kullandığımız ketamin hızlı etki başlangıçlı, kuvvetli analjezik ve hafif narkotik özelliklere sahiptir (Tso et al. 2004). Fensiklidin analogu bir ajan olarak 1960'lı yılların sonuna doğru klinik kullanımda yer almaya başlamıştır (Hirota and Lambert 1996). Ketaminin insanlarda terapötik amaçla kullanımı çok yaygın olmasa da; travmalarda, acil operasyon gereken durumlarda, pediatrik hasta grubunda ve ayrıca veteriner hekimlikte kullanımı mevcuttur (Moore et al. 2001, Whittington et al. 2002). Ketamin etkisini NMDA reseptör blokajı yaparak gösterir. Spesifik olarak NMDA reseptörleri üzerinde bulunan fensiklidinin bağlanma bölgelerine zayıf olarak bağlanarak nonkompetitif blokaj yapar (Shiue et al. 1997). Bu etkisi ile birlikte aynı zamanda ketamin İ-R hasarından koruyucu etkiye sahiptir (Camara-Lemarrooy et al. 2009, Guzman et al. 2010).

2.7. AMANTADİN

Amantadin ilk olarak Asya İnfluenzasına karşı kullanılmış ve 1966 yılında bu hastalığa karşı koruyucu ajan olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde onaylanmıştır (Hubsher et al. 2012). Amantadin, NMDA reseptörünün nonkompetitif antagonistidir. Bu reseptör glutaminerjik bir reseptör tipidir ve amantadin direkt/indirekt olarak glutaminerjik ve dopaminerjik sinyal etkisine sahiptir (Danysz et al 1997, Farnebo et al. 1971). Aynı zamanda amantadinin antikolinergik (örn; ağız kuruluğu, kabızlık, üriner retansiyon) ve NMDA reseptör antagonistik etkinlikleri (örn; halüsinasyonlar) mevcuttur (Metman et al. 1999). Bilinç bozukluğu nedeni ile tedavi edilen nörorehabilitasyon sürecindeki hastalarda amantadin en sık kullanılan ilaçlar arasındadır (Giacino et al. 2012). Glutamat antagonistik etki ile postsinaptik membranda inhibisyona neden olur ve uyanıklığı artırır (Saniova et al. 2004). Bu nedenle Parkinson tedavisinde, travmatik beyin hasarı olan olgularda, hipoksik iskemik ensefalopatide, postoperatif dönemde hastaların uyanıklık ve emosyonel fonksiyonlarını arttırmak için kullanılır (Aksu ve ark 2013). Yapılan çalışmalarda amantadinin hem direkt dopamin agonisti olarak etki göstermesi hem de NMDA

reseptörleri üzerine antagonist etkisi nedeniyle travmatik beyin hasarı gelişmiş hastalarda nörokognitif iyileşmelere katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Giacino et al 2012, Saniova et al. 2004, Meythaler et al 2002). Saniova ve arkadaşları (2004) 74 hastalık bir grup ile yaptıkları retrospektif çalışmada amantadin tedavisi alan hastalarda almayanlara göre Glasgow koma skalasında belirgin düzelme olduğunu ve daha düşük ölüm hızları olduğunu (%51 vs %6) rapor etmişlerdir.

2.8. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

2.8.1. Apolipoprotein A1 (APO A1)

Apo A1, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve şilomikronların yapısında bulunan 28 kDa ağırlığında bir apolipoproteindir (Favari et al 2015). Plazmada lipit taşıyıcısı olarak görev alır (Hegele 2009). Plazmada bulunup kan beyin bariyerinden geçebilen ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda en bol bulunan proteinlerden biridir (Elliott et al. 2010). Santral sinir sisteminin başlıca kolesterol taşıyıcıları, Apo A1 ve Apo E taşıyan HDL benzeri moleküllerdir. HDLR sınıfının ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları (ABCA1 ve ABCG1), Apo A1'in hücrese reseptörleridir Apo A1'in ABCA1'e bağlanması, hücreden lipid ekstraksiyonuna aracılık eder ve bu süreç, birkaç hücre içi yolağın merkezini oluşturur (Zhao et al. 2012). Bunlar arasında bizim için önemli olanlar, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve inflamatuvar süreçlerle ilgilidir. ABCA1 ile bağlandığında Apo A1, Cdc42'yi aktive eder ve ardından aktin polimerizasyonuna neden olur (Nofer 2006). Bu yol, aktin depolimerizasyonu ile akson büyüme konisi çökmesinin kritik bir olay olduğu nöronal hasar sonrası nöron dejenerasyonunun zemininde önemlidir (Fournier et al. 2001, Fournier et al. 2003). Apo A1'in turnover hızı immünolojik olaylara bağlıdır. Örneğin sepsis durumunda yarılanma ömrü kısalır ve kötü prognoz göstergesidir (Van Leeuwen et al. 2003). Yapılan çalışmalarda Apo A1'in sinir sistemi ile ilişkili bir molekül olduğunu gösterilmiştir. Lipid metabolizma genlerinin, özellikle de Apo A1'in travmatik beyin hasarı ile epilepsi modeli oluşturulan ratlarda upregüle olduğu bildirilmiştir (Ueda et al. 2013).

2.8.2. Beyin Natriüretik Peptid (BNP)

BNP nöronal, hormonal stimülasyon ve sıvı yüklenmesine yanıt olarak kalpten salgılanan bir proteindir (Levin et al. 1998). Atriumdan salınmasına rağmen etki yeri ventriküldür. Yani BNP beyine spesifik bir peptid değildir ama özellikle hipotalamus olmak üzere beyinde de üretilir. Hipotalamusta BNP üretiminde artış olması için olası iki mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi humoral veya parakrin sinyallere yanıt olarak sekonder salınım, ikincisi ise vazokonstrüksiyona yanittir. Bazı kaynaklar subaraknoid kanama sonrası görülen serebral iskemiye buna bağlamaktadır (Taub et al. 2011). BNP, sepsis veya hemorajik şokta tanımlandığı gibi sistemik inflamasyon ve lokal tromboz ile karakterize edilen genel bir mikrodolaşım disfonksiyonu sürecinin bir belirteci olabilir (Zakynthinos 2008). Bir çalışma BNP'nin proinflamatuvar sitokin salınımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Bold 2009). Yapılan çalışmalarda BNP'nin gecikmiş iskemik nörolojik defisit ile ilişkili olduğu görülmüştür (Berendes et al. 1997, Tomida et al. 1998). Yapılan hücre kültür çalışmalarında natriüretik peptidlerin nöroprotektif etkileri olduğu görülmüştür. BNP'nin de aynı şekilde beyin hasarında nöroprotektif etkisi olduğu görülmüştür. James ve arkadaşları (2010) yaptıkları beyin hasar modelinde, BNP'nin i.v. uygulamasının, serebral kan akımını arttırdığını ve inflamasyonu azalttığını bu şekilde de nörodejenerasyonu azalttığını göstermişlerdir. Travmatik beyin hasarı (Kirchhoff et al. 2006, Powner et al. 2007), şok (Koenig et al. 2007) ve diğer beyin hasarlarında (Mcgirt et al. 2004, James et al. 2009) BNP seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür.

2.8.3. Nöron Spesifik Enolaz (NSE)

Enolazlar, 2-fosfoglisarat molekülünün fosfoenolpiruvata dönüşümünü katalizleyen glikolitik bir enzimdir. Enolaz enzimlerin vücudun farklı yerlerinde farklı izozimleri bulunur. Enolaz α her yerde bulunur, enolaz β kasa özgüdür ve enolaz γ nörona özgüdür (NSE) (Shimizu et al. 1983, Merkulova et al. 2000). NSE $\gamma\gamma$ veya $\alpha\gamma$ dimerik izozimler olarak iki farklı şekilde bulunabilir ve bu izozim formları nöronlar ve periferik nöroendokrin hücreler için bir belirteçtir. NSE'nin γ formu nöronlarda eksprese edilirken, $\alpha\gamma$ formu mikroglia, oligodendrosit ve astrositlerde eksprese edilir (Piaśt et al. 2005, Hafner et al. 2013). Hem plazma hem de BOS'ta ölçülebildiği için NSE'nin nöron ve beyin hasarı değerlendirmede bir belirteç olabileceği

düşünülmüştür (Egun ve ark. 1998, Johnsson et al. 2000) Bu belirteç, nöronal fonksiyonel değişiklikleri değerlendirmek için kullanılmıştır. NSE, travmatik beyin hasarında hücre yıkımından sonra plazmaya pasif olarak salınır. Vos ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada travmatik beyin hasarı olan hastalarda NSE plazma konsantrasyonunun, normal referans değerlerinden iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 05.02.2020 tarih ve 10 sayılı kararıyla etik kurul onayı almış olup, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2020-7-25-24 kod numarası ile desteklenmeye uygun bulunmuştur. Çalışmamızdaki deney hayvanları üzerindeki uygulamalar Sakarya Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEK SEÇİMİ

Oluşturulan gruplarda 3R ilkesine dayanarak denek sayısının belirlenmesinde istatistiksel olarak, %95 güven aralığında güç analiz testi yapılmıştır. Yapılan güç analizin deneysel ve kontrol sağ kalım eğrilerinin olasılık (güç) 0,80'e eşit olduğunda boş(null) hipotezi reddetmek için toplam 25 (toplam denek sayısı) deneğe ihtiyaç vardır. Bunun içinde her bir denek grup azami sayısı (toplam denek sayısı/grup sayısı) 6 olarak belirlenmiştir. Null hipotezin bu testle ilgili Tip I hata olasılığı 0,05'tir. Dolayısıyla her grup için 6 adet ratın alınmasının yeterli olacağı hesaplanmıştır

Güç analizi hesaplanması ile çalışmamızda 24 adet Wistar cinsi 290-416g ağırlıklarında erişkin erkek ratlar kullanıldı. Ratlar, araştırma başlangıcına kadar ortama adaptasyon sağlamaları açısından 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda barındırıldı. Ratlar ışık ve sıcaklık standardize edilmiş bir ortamda bakıldı. Standart sıçan besini (pellet yemi) alan hayvanlara herhangi bir kısıtlama uygulanmadı.

3.2. YÖNTEM

Ratlar rastgele 6'şarlı gruplara ayrıldı.

Grup S: Sham grubu

Grup A: Amantadin-45 grubu

Grup I-R: İskemi-Reperfüzyon grubu

Grup I-R/A: İskemi Reperfüzyon+Amantadin-45 grubu

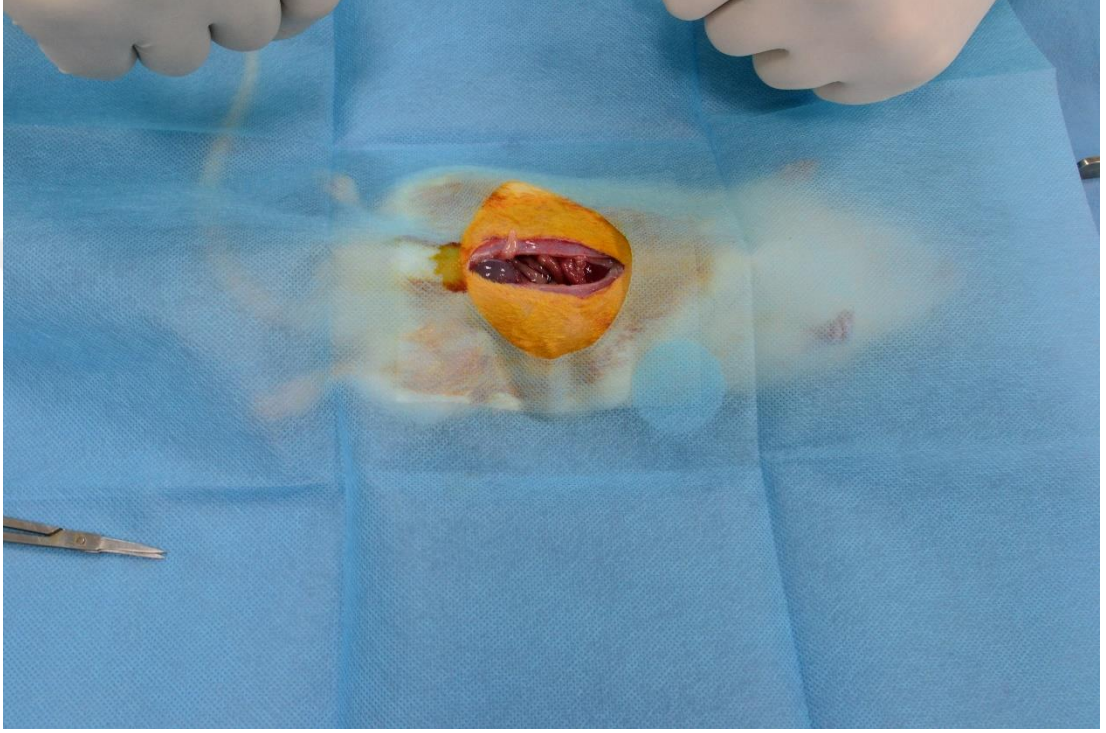
Anestezi verilmeden önce ratların ağırlıkları ölçüldü. Ratlara 100 mg/kg ketamin (Ketalar® 1 ml:50 mg, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 15 mg/kg ksilazin (Xylazinbio® %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) intraperitoneal (i.p.) uygulaması ile anestezi sağlandı. Abdominal bölgeleri insizyon öncesinde tıraş edildi (Resim 1). %10 povidon iyodin solüsyonu ile silinerek cerrahi alanda antisepsi sağlandı.



Resim 1. Ratların tıraşlanması

Isı kaybını engellemek ve hipotermiden kaçınmak amacıyla ısıtıcı blanket kullanıldı. Isı monitörizasyonu için ise rektal termometre kullanıldı. Yeterli anestezi derinliği ağırlı uyarana yanıtızlık ile değerlendirildi ve sonra hidrasyon sağlamak için kuyruk veninden 24 Gauge (G) intravenöz kanül (IV Flon Ar-Es, İzmir, Türkiye) ile kanülasyon yapıldı. Anestezi idamesi için ratlara düzenli aralıklarla i.p. enjeksiyon uygulanmaya devam edildi.

Grup Sham'da i.p. ketamin ve ksilazin enjeksiyonu sonrası yeterli anestezi derinliği sağlandı. Kuyruk venine i.v. kanülasyon yapıldı ve 15 dakika hiçbir işlem yapılmadan beklendi. Sonrasında orta abdominal insizyon yapıldı (Resim 2) fakat ratlara insizyon dışında herhangi bir ek müdahale yapılmadı.



Resim 2. Orta abdominal hat insizyonu

Grup A 'da i.p. ketamin ve ksilazin enjeksiyonu sonrası yeterli anestezi derinliği sağlandı. Kuyruk venine i.v. kanülasyon yapıldı ve amantadin (Amantadine hydrochloride[®], A1260-5G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 45 mg/kg i.p. yolla verildi. 15 dakika hiçbir işlem yapılmadan beklendi. Sonrasında orta abdominal insizyon yapıldı fakat ratlara herhangi bir müdahale yapılmadı.

Grup I-R'de i.p. ketamin ve ksilazin enjeksiyonu sonrası yeterli anestezi derinliği sağlandı. Kuyruk venine i.v. kanülasyon yapıldı ve 15 dakika sonra orta abdominal insizyon yapıldı. İnfrarenal abdominal aorta eksplore edilerek aortaya atravmatik mikrovasküler klemp koyuldu (Resim 3). 120 dakikalık iskemi süresince beklendi. Sonrasında atravmatik vasküler klemp çıkarıldı ve 120 dakika reperfüzyon süresince beklendi.



Resim 3. İnfrenal abdominal aortaya konulan mikrovasküler klemp

Grup I-R/A'da i.p. ketamin ve ksilazin enjeksiyonu sonrası yeterli anestezi derinliği sağlandı. Kuyruk venine i.v. kanülasyon yapıldı, amantadin 45 mg/kg i.p. yolla verildi. 15 dakika sonra orta abdominal insizyon yapıldı. İnfrenal abdominal aorta eksplere edilerek aortaya atravmatik mikrovasküler klemp koyuldu. 120 dakikalık iskemi süresince beklendi. Sonrasında atravmatik vasküler klemp çıkarıldı ve 120 dakika reperfüzyon süresince beklendi.

Tüm gruptaki deneklere reperfüzyon işlemi sonunda aortadan vacutainer (21 G-BD Vacutainer® Safety-Lok™ blood collection set) ile antikoagulan içermeyen tüplere kan alındı (Resim 4). Bu şekilde hem ötenazi yapılmış hem de çalışmada kullanılacak kan örnekleri alınmış oldu. Daha sonra ötenazi uygulanan ratların siyatik sinir ve beyin dokuları çıkarıldı (Resim 5). Alınan doku örnekleri %10 formaldehit solüsyonuna koyuldu.



Resim 4. Vacutainer ile kan alınması ve ötenazi



Resim 5. Beyin ve siyatik sinir dokusu

3.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Ratlardan alınan venöz kan örnekleri sarı kapaklı, antikoagülan içermeyen biyokimya tüplerine konularak biyokimya laboratuvarına gönderildi. Gelen numunelerin pıhtılaşma süreci tamamlanması beklendi. Daha sonra 10 dk, 4000g'de santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Elde edilen numuneler porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -80°C ' de muhafaza edildi. Çalışma gününde öncelikle oda ısısına getirilen numuneler homojenize edilerek Rat Brain Natriüretic Peptide, Rat Neuron Specific Enolase, rat Apolipoprotein A1 seviyeleri, BT LAB (Bioassay Technology Laboratory, Zhejiang, China) marka ticari ELISA kiti ile enzim bağlı immünoabsorbent yöntemi ile çalışıldı.

Çalışma aşağıda tarif edilen şekilde yapıldı:

1. Monoklonal antikolar ile kaplı kuyucuklar içerisine numuneler uygun hacimde pipetlendi.
2. Kuyucuklardaki antikolara bağlanmış numunedeki partiküllere bağlanmak üzere işaretli monoklonal antikoları pipetlendi.
3. Kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara streptavidin-HRP konjugatı pipetlenerek reaksiyona girmesi için 37°C 'de 60 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında numuneyle bağlanmamış antikoları uzaklaştırma amacı ile yıkama yapıldı.
5. Oluşan bileşiğin renklendirilmesi için kromojen A ve B solusyonları sırası ile eklenerek ve 37°C 'de 10 dk inkübe edildi.
6. Oluşan reaksiyon sonunda mavi renk oluştu. Reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her bir kuyucuğa stop solusyonundan eklendi. Mavi rengin sarıya dönmesi ile reaksiyonun sonlandığı anlaşıldı. Oluşan sarı renkteki yoğunluğun analiz ölçümü mikroelisa okuyucuda uygun dalga boyuna ayarlanarak kolorimetrik olarak yapıldı.
7. Standart değerleri ve bu değerlere karşılık gelen optik yoğunluk değerleri eşleştirildi. Sonra standartların doğrusal regresyon eşitlik grafiği oluşturuldu. Numunelerin optik yoğunluk değerleri ile standart grafiğindeki

konsantrasyonlar eşleştirildi. Numune konsantrasyonları otomatik olarak hesaplandı. Sonuçlar rat Apolipoprotein A1 için ug/ml, rat Brain Natriüretik Peptide için ng/L ve rat Neuron Spesifik Enolase için ng/ml olarak verildi.

ELISA Kit insertinde rat Apolipoprotein A1 için ise Range: 0,05-20 ug/ml Sensitivity: 0,022 ug/ml, rat beyin natriüretik peptid için Range: 1-400 ng/L Sensitivity: 0,54 ng/L ve rat nöron spesifik enolaz için Range: 0,2-60 ng/mL Sensitivity: 0,09 ng/mL olarak verildi.

Üretici firmanın yaptığı presizyon çalışmasında kitlerin çalışma içi %CV'si <%8, çalışmalar arası %CV'si <%10 olarak verilmiştir.

3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Alınan doku örnekleri inceleme yapılacak güne kadar %10 formaldehit solüsyonunda, +4 derecede muhafaza edildi. Örnek materyaller Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Histoloji ve Embriyoloji Kliniği'nin laboratuvarında değerlendirildi.

3.4.1. Işık Mikroskobu Takibi

Doku örnekleri 18 saat %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde bekletilerek fikse edildi. Doku dehidratasyonu için sırası ile %70, %80, %90, %96 ve %100 alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında ksilen (Merck 108323) ile saydamlaştırıldı. Dokular kesit alınması için hazırlanmak üzere 56°C'lik etüv içerisinde (Herdeus) 2 saat sıvı parafinde (Kimetsan KIMPNB/OICP/040220) bekletildikten sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Leica RM 2255 marka mikrotom kullanılarak 4-5 dokulardan mikronluk kesitler alındı. Dokuda görmek istediğimiz yapıya özgün hematoksilin ve toluidin mavisi ile boyandı. Nikon marka ışık mikroskobu ile histolojik değerlendirme yapıldı.

3.4.2. İmmünohistokimya Uygulaması

Kaspazlar genel olarak DNA replikasyonundan ve tamirinden sorumlu olan enzimleri inaktive ederler (Adrain C. Et al 2001). Bu nedenle apoptozisi göstermek adına doku örneklerinde kaspaz-3 işaretlemek için immünohistokimya (IHC) çalışması yapıldı. Bu boyama yöntemi kullanıldığında kaspaz-3 yoğunluğu sinir hücresi hasarını göstermektedir. Boyama protokolümüz aşağıda anlatılan seride olduğu gibidir.

Parafin bloklardan alınan 4-5 mikronluk doku kesitleri Poly-L-Lysine sürülmüş lamalar üzerine alınarak, bir gece 56°C etüvde tutulup parafini giderildi. Aşağıda anlatılan seriden geçirilerek saf suya indirildi.

Ksilen.....2x10 dk
Saf Alkol.....2x5 dk
%96 Alkol...2x5 dk
%90 Alkol...2x5 dk
%70 Alkol...2x5 dk
Saf Su.....1x5 dk

Endojen peroksidazı maskeleyerek için kesitler karanlıkta %0,5'lik H₂O₂-metanol içerisinde 10 dk bekletildi. 2 kere fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde yıkandı. Antijenin geri dönüşümünü sağlamak için kesitler, içinde 10mM Sitrat tampon (pH=6) olan saleye konarak mikrodalga fırında 5 dk'lık periyotla 2 kere bekletildi. Doku kesitleri mikrodalga fırından çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakıldı. Tekrar 2 defa PBS ile yıkandı. Kesitler immünohistokimya kabına konularak 30 dakika Ultra V Block (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı. 30 dakika 1/200 oranında sulandırılmış primer antikor (Neomarkers marka) Rabbit kaspaz-3 uygulandı. 2 kere daha PBS ile yıkandıktan sonra 30 dakika Biotinlated Goat anti-Rabbit (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) sekonder antikorunu uygulanarak 2 kere PBS ile yıkandı. 30 dk Streptavidin Peroxidase (LabVision marka UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulanarak, 2 kere PBS ile yıkandı. 20 dk kromojen (LabVision marka AEC

Substrat System) karanlıkta dokulara uygulandı. (20ml AEC kromojen + 1 ml AEC substrat iyice karıştırıldı) Saf su içerisinde çalkalandı. 10 dk Hemalun ile zıt boyama yapıldı. 7 dakika çeşme suyunda bekletildikten sonra preparatlar kurulanıp kapatıcı (ScyTek marka Aqueous Mounting Medium) ile kapatıldı.

Ratların beyin korteks ve siyatik sinirindeki hasara uğramış hücrelerin kaspaz-3 boyanma yüzdeleri H-score yöntemi ile tespit edildi. Rasgele beş alan seçilerek boyanma derecesi skorlaması yapıldı. Skoru en yüksek olan alan tespit edildi. Her grup içinde, her X40 büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi boyanma derecesinin kriteri olarak alındı. Semikantitatif bir yöntem kullanılarak skorlama yapıldı. Boyanma derecesine göre şu şekilde sınıflandı: boyanma yok (0), zayıf boyanma (+1), orta boyanma (+2), güçlü boyanma (+3). Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-SCORE adı verilen ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak yapıldı.

H Score= (3 x güçlü boyanan çekirdek yüzdesi) + (2 x orta derecede boyanan çekirdek yüzdesi + (1X zayıf boyanan çekirdek yüzdesi)

3.4.3. Toluidine mavisi boyama ve prosedürü

Toluidine mavisi ile boyama myelinizasyonu göstermek için kullanılmaktadır. Yapılan boyamada periferik sinir hücrelerinin etrafındaki Schwann hücrelerinin varlığı myelinizasyonu göstermektedir.

Preparatlara toluidine mavisi ile boyama için aşağıdaki işlemler uygulandı.

Kimyasallar	Süre
Ksilol	3 dk
Ksilol	4 dk
%100'lük alkol	15-20 sn
%80'lik alkol	15-20 sn
Distile su	3,5 dk

Toluidine blue (Sigma-Aldrich)	5 dk
Akar su altında yıkama	1 dk
%80'lik alkol	15-20 saniye
%100'lük alkol	15-20 saniye
Ksilol	4 dk
Ksilol	4 dk
Entellan ile kapatma	

3.4.4. Hematoksilen-Eozin boyama ve prosedürü

Histolojik incelemede beyin korteksini ve periferik sinir olarak da siyatik siniri inceledik. Hematoksilen-eozin boyama ile Schwan hücrelerini ve akson hasarını değerlendirdik.

Parafini eriyen preparatlara aşağıdaki işlemler uygulandı.

Kimyasallar	Süre
Ksilol	3 dk
Ksilol	4 dk
%100'lük alkol	15-20 sn
%80'lik alkol	15-20 sn
Distile su	3,5 dk
Harris' Hematoksilen (Merck)	3 dk
Akar su altında yıkama	1 dk
Eozin (Sigma-aldrich)	1 dk
%80'lik alkol	15-20 saniye
%100'lük alkol	15-20 saniye
Ksilol	4 dk
Ksilol	4 dk
Entellan ile kapatma	

Histopatolojik iyileşmeyi 0-3 arası modifiye bir skala ile değerlendirdik. Kesitleri; dört dereceli skorlama yaparak histopatolojik iyileşme de ele alınan Schwann hücre

yoğunluğu, akson hasar düzeyi ve miyelinizasyon için aşağıdaki parametreler ile 0 ve 3 puan arasında değerlendirdik. Buna göre:

0: Yok

1: Minimal düzeyde

2: Orta düzeyde

3: İleri düzeyde

3.5. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, birinci çeyreklik, üçüncü çeyreklik, frekans, yüzde) kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafiksel incelemeler ile sınıandı. Normal dağılım gösteren nicel değişkenlerin ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi ve Bonferroni düzeltilmeli ikili değerlendirmeler kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis test ve Mann Whitney U test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Grupların rat ağırlıkları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3). Ortalama rat ağırlıkları $354,62\pm 27,14$ gramdır.

Tablo 3. Rat ağırlıklarının gruplara göre dağılımı

	n	Rat ağırlığı (gr)			p
		Ort±SD	Median	Min-Mak	
SHAM	6	350,83±26,91	360,0	300-375	0,846
AMANTADİN	6	345,00±33,46	350,0	290-380	
I/R	6	365,83±30,79	361,0	323-416	
I/R-AMAN	6	356,83±17,63	356,0	339-380	
Total	24	354,62±27,14	357,5	290-416	

^aKruskal-Wallis Test

Ratların APO A1, BNP ve NSE değerleri Tablo 4'te verilmiştir. Gruplar arasında Apo A1, BNP ve NSE değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu. ($p>0,05$) (Tablo 4).

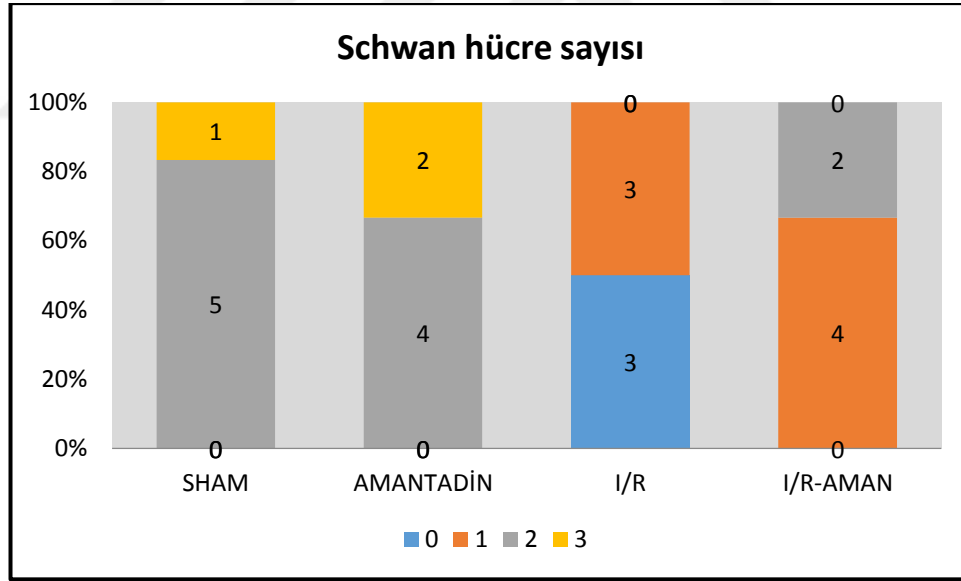
Tablo 4. Elisa Testi sonuçlarının dağılımı

		SHAM	AMANTADİN	I-R	I-R/A	p
APO A1 (ug/mL)	Medyan (Q1-Q3)	1,0 (0,8-1,4)	1,8 (1,3-2,1)	1,6 (1,2-3,9)	1,7 (1,2-2,1)	^a0,221
	Ort±Ss	1,07±0,51	2,19±1,39	2,17±1,48	1,70±0,84	
BNP (ng/L)	Medyan (Q1-Q3)	22,2 (17,8-26,6)	21,8 (18,9-32,8)	18,4 (16,2-21,1)	24,8 (21-26,2)	^a0,299
	Ort±Ss	23,11±6,19	25,23±8,58	19,21±4,23	25,07±4,39	
NSE (ng/mL)	Medyan (Q1-Q3)	3,3 (2,9-4,5)	3,7 (2,8-4,4)	3,9 (3,4-4,4)	3,3 (3,0-4,2)	^b0,690
	Ort±Ss	3,69±1,04	3,74±0,90	3,93±1,04	3,25±1,06	

^aKruskal-Wallis Test

^bOne Way Anova Test

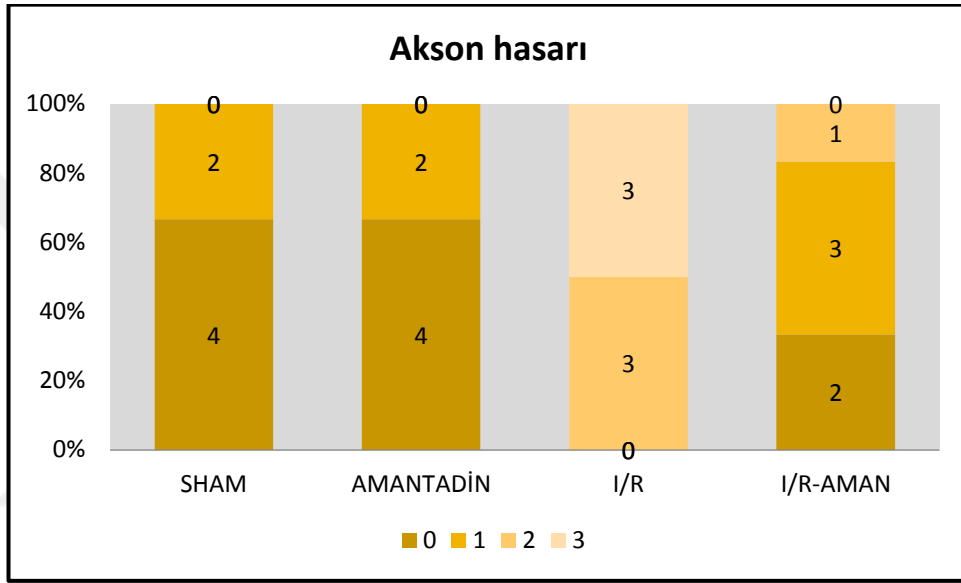
Histopatolojik değerlendirmeye göre bakıldığında Grup S'deki Schwann hücre dağılımına bakıldığında 5 ratın orta düzey ve 1 ratın ileri düzeyde olduğu görüldü. Grup A'da ise 4 ratın orta düzey ve 2 ratın ileri düzeyde olduğu görüldü. Grup I-R'de 3 rat yok ve 3 ratta minimal düzeyde olduğu görüldü. Grup I-R/A'da ise 4 ratta minimal düzey ve 2 ratta orta düzey olduğu görüldü (Tablo 5). Bu bulgular değerlendirildiğinde ratların Schwann hücre sayısı, gruplara göre istatistiksel anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 5). Bu farklılığı belirlemek için yaptığımız ikili karşılaştırmalara göre I-R ve I-R/A grubunda Schwann hücre sayısı Grup S'ye göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır ($p=0,002$; $p=0,018$) (Tablo 5 ve 6). Grup A'da Schwann hücre sayısı yine I-R ve I-R/A gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p=0,003$; $p=0,014$) (Tablo 5 ve 6). I-R/A grubunda Schwann hücre sayısı I-R grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p=0,030$) (Tablo 5 ve 6).



Şekil 6. Schwann hücre sayısındaki değişikliklerin gruplara göre dağılımı

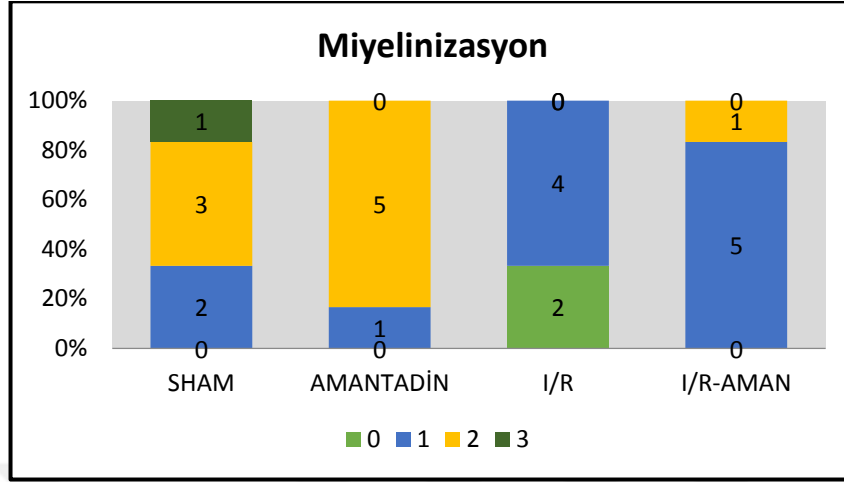
Akson hasarı değerlendirmesinde Grup S ve Grup A'da 4 ratta hasar yok ve 2 ratta minimal düzeyde olduğu görüldü. Grup I-R'de ise 3 ratta orta düzey ve 3 ratta ileri düzey hasar olduğu görüldü. Grup I-R/A'da 2 rat da hasar yok, 3 ratta minimal düzey ve 1 ratta orta düzey hasar olduğu görüldü (Tablo 5). Ratların akson hasarı değerlendirildiğinde, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık

göstermektedir ($p=0,002$; $p<0,01$) (Tablo 5). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre, Grup S ve A'da ratlardaki akson hasarı, I-R grubu ratlardakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,003$ ve $p=0,003$) (Tablo 5 ve 6). Grup I-R/A'deki ratların akson hasarı Grup I-R'ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,006$) (Tablo 5 ve 6). Diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5 ve 6).



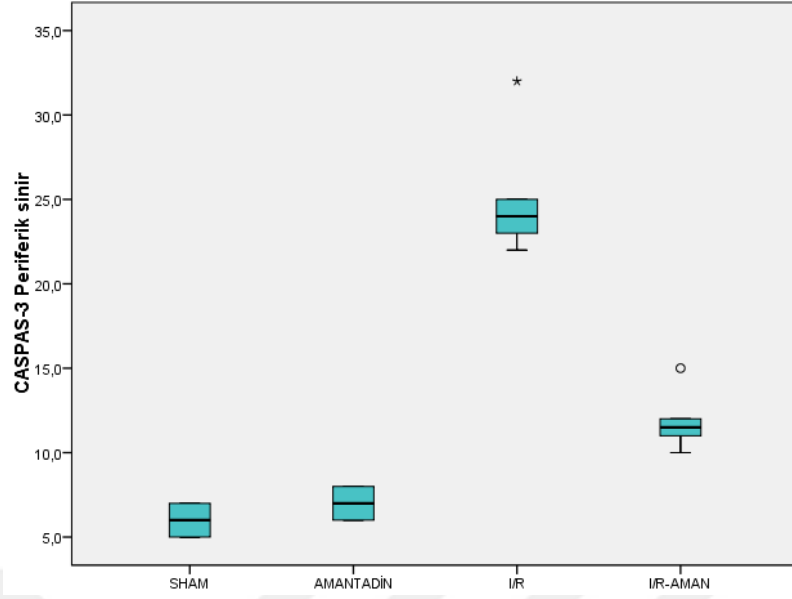
Şekil 7. Akson hasarı artışının gruplara göre dağılımı

Miyelinizasyon hasarı düzeylerine bakıldığında Grup S'de 2 ratta minimal düzey, 3 ratta orta düzey ve 1 ratta ileri düzey olduğu görüldü. Grup A'da 1 ratta minimal düzey ve 5 ratta orta düzey olduğu görüldü. Grup I-R'de 2 ratta yok ve 4 ratta minimal düzey olduğu görüldü. Grup I-R/A'da ise 5 ratta minimal düzey ve 1 ratta orta düzey olduğu görüldü (Tablo 5). Ratların miyelinizasyon değerleri, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,007$; $p<0,01$) (Tablo 5). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre, Grup I-R'nin miyelinizasyon değeri, Grup S ve Grup A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,016$; $p=0,006$; $p=0,027$) (Tablo 5 ve 6). Grup A'nın miyelinizasyon değerleri de Grup I-R/A'ya göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p=0,027$) (Tablo 5 ve 6). Diğer gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5 ve 6).



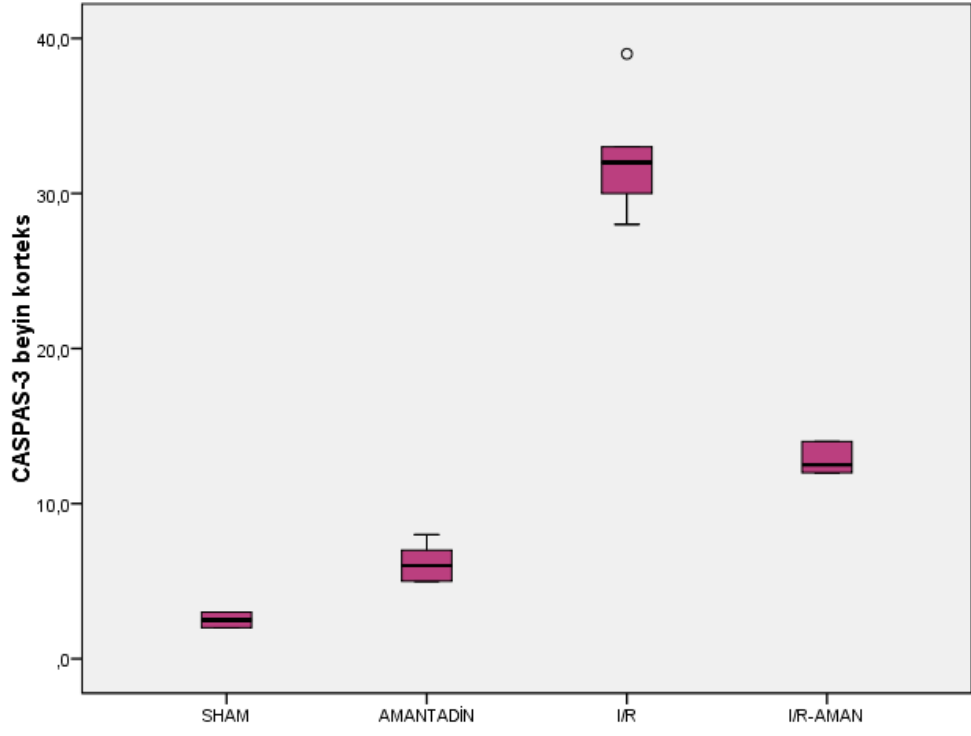
Şekil 8. Miyelinizasyon değerlerinin gruplara göre dağılımı

Ratların siyatik sinir kaspaz-3 değerleri, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 5). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre, Grup S’de siyatik sinir kaspaz-3 değeri, I-R ve I-R/A gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,004$; $p=0,004$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6). Grup A’nın siyatik sinir kaspaz-3 değeri Grup I-R ve Grup I-R/A’dan anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,004$; $p=0,004$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6). Grup I-R/A’nın siyatik sinir kaspaz-3 değeri Grup I-R’den anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,004$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6). Grup S ve Grup A arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 5 ve 6).



Şekil 9. Siyatik sinir kaspaz-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı

Ratların beyin korteksi kaspaz-3 değerleri, gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,001$; $p<0,01$)(Tablo 5). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre, Grup S'nin beyin korteksi kaspaz-3 değeri, Grup A, Grup I-R ve Grup I-R/A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,003$; $p=0,003$; $p=0,003$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6). Grup A'da beyin korteks kaspaz-3 değeri Grup I-R ve Grup I-R/A'dan anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,004$; $p=0,004$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6). Grup I-R/A'da beyin korteks kaspaz-3 değeri Grup I-R'den anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,004$; $p<0,01$) (Tablo 5 ve 6).



Şekil 10. Beyin korteksi kaspaz-3 değerlerinin gruplara göre dağılımı

Tablo 5. Histopatolojik deęişiklerin deęerlendirmeleri

		SHAM	AMANTADİN	I-R	I-R/AMAN	p
Schwan	0	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	
hücre sayısı	1	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (50,0)	4 (66,7)	
	2	5 (83,3)	4 (66,7)	0 (0,0)	2 (33,3)	
	3	1 (16,7)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<i>Medyan(Q1-Q3)</i>	2 (2-2)	2 (2-3)	0,5 (0-1)	1 (1-2)	^a 0,001*
	<i>Ort±Ss</i>	2,20±0,40	2,30±0,50	0,50±0,50	1,30±0,50	*
Akson hasarı	0	4 (66,7)	4 (66,7)	0 (0,0)	2 (33,3)	
	1	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	3 (50,0)	
	2	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (50,0)	1 (16,7)	
	3	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (50,0)	0 (0,0)	
	<i>Medyan(Q1-Q3)</i>	0,0 (0-1)	0 (0-1)	2,5 (2-3)	1 (0-1)	^a 0,002*
	<i>Ort±Ss</i>	0,30±0,50	0,30±0,50	2,50±0,50	0,80±0,80	*
Miyelinizasyon	0	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (33,3)	0 (0,0)	
	1	2 (33,3)	1 (16,7)	4 (66,7)	5 (83,3)	
	2	3 (50,0)	5 (83,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	
	3	1 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<i>Medyan(Q1-Q3)</i>	2 (1-2)	2 (2-2)	1 (0-1)	1 (1-1)	^a 0,007*
	<i>Ort±Ss</i>	1,80±0,80	1,80±0,40	0,70±0,50	1,20±0,40	*
Kaspaz-3	<i>Medyan(Q1-Q3)</i>	6 (5-7)	7 (6-8)	24 (23-25)	11,5 (11-12)	^a 0,001*
Siyatik Sinir	<i>Ort±Ss</i>	6,00±0,90	7,00±0,90	25,00±3,60	11,80±1,70	*
Kaspaz-3	<i>Medyan(Q1-Q3)</i>	2,5 (2-3)	6 (5-7)	32 (30-33)	12,5 (12-14)	^a 0,001*
Beyin Korteks	<i>Ort±Ss</i>	2,50±0,50	6,20±1,20	32,30±3,70	12,80±1,00	*

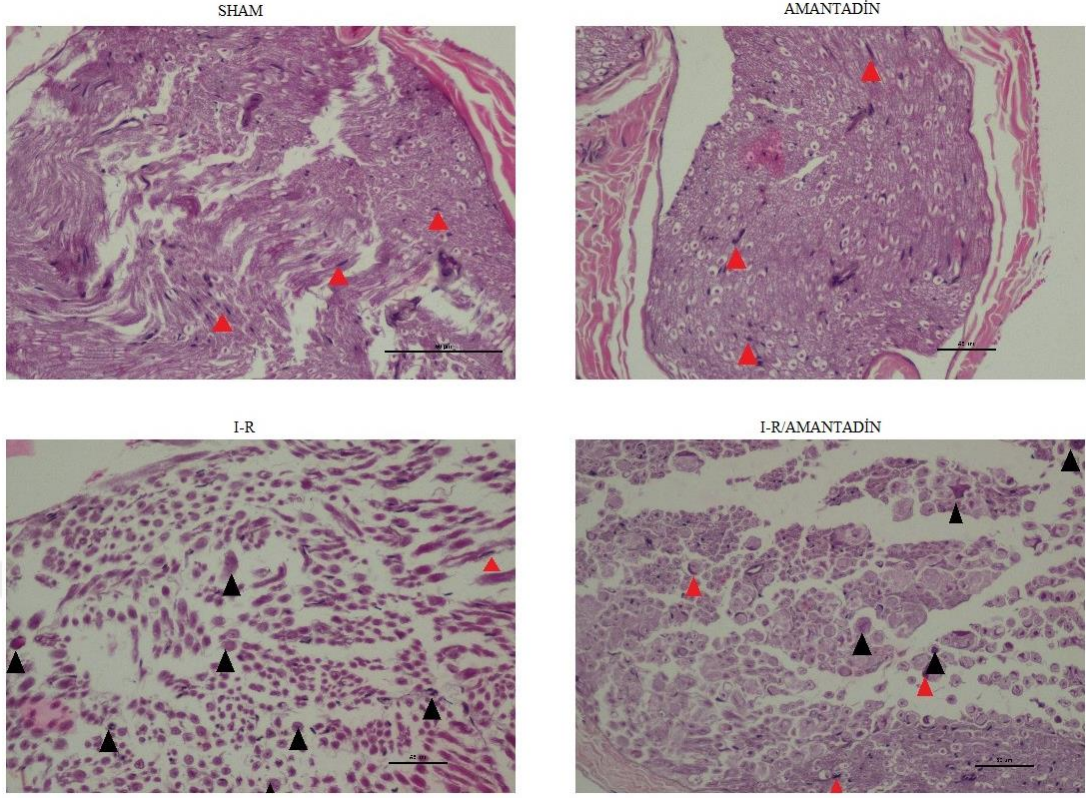
^aKruskal-Wallis Test

**p<0,01

Tablo 6. Histopatolojik değişiklerin Post Hoc değerlendirme Sonuçları

	Schwan hücre sayısı artışı	Akson hasarı	Miyelinizasyon	Kaspaz-3 Siyatik Sinir	Kaspaz-3 Beyin Korteks
SHAM ile AMANTADİN	0,523	1,000	0,923	0,096	0,003**
SHAM ile I/R	0,002**	0,003**	0,016*	0,004**	0,003**
SHAM ile I/R-AMAN	0,018*	0,212	0,083	0,004**	0,003**
AMANTADİN ile I/R	0,003**	0,003**	0,006**	0,004**	0,004**
AMANTADİN ile I/R-AMAN	0,014*	0,212	0,027*	0,004**	0,004**
I/R ile I/R-AMAN	0,030*	0,006**	0,092	0,004**	0,004**
<i>Mann Whitney U test</i>		<i>*p<0,05</i>		<i>**p<0,01</i>	

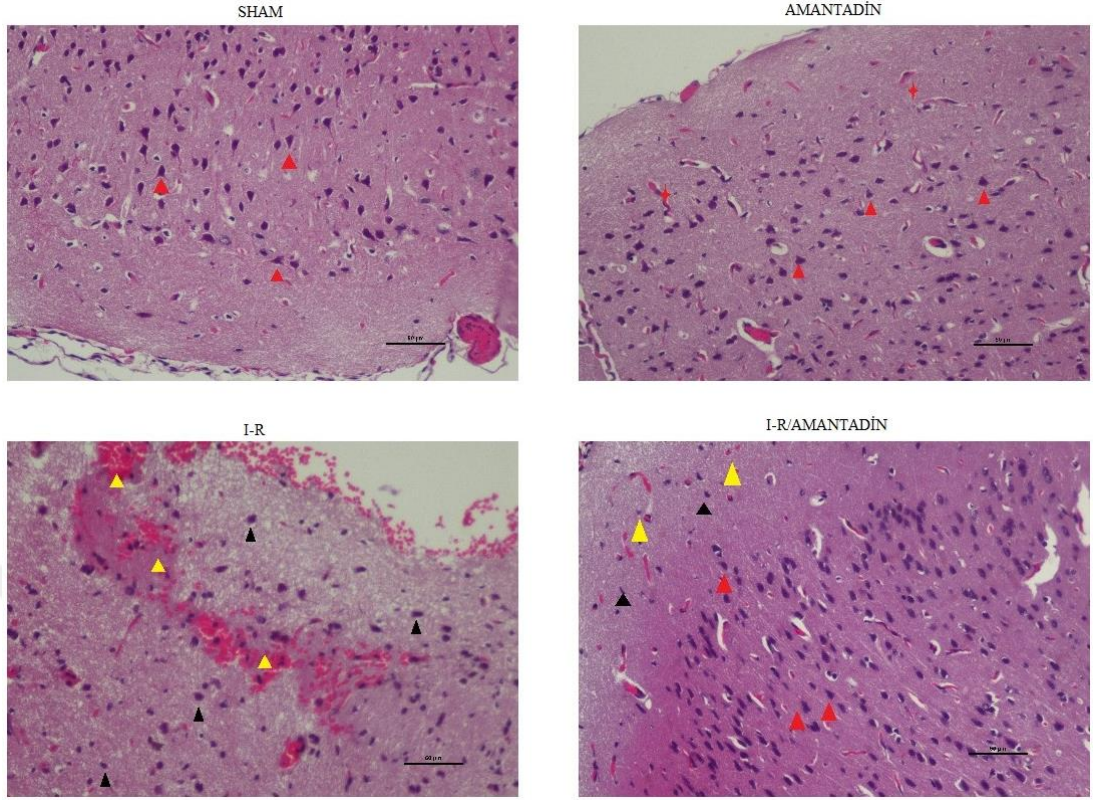
Siyatik sinir dokusunun hemotoksilen-eozin boyaması Resim 6 de görülmektedir. Grup S ve Grup A'da siyatik sinir yapısı bütünlük göstermektedir. Grup I-R'de siyatik sinir bütünlüğü bozulmuş ve sinir hücreleri arasındaki mesafe artmıştır, hasarlı sinir hücre sayısı ve akson hasarı artmıştır ayrıca gruplar içerisinde en fazla hasar da bu grupta görülmektedir. Grup I-R/A'da ise Grup I-R'ye göre sinir dokusu bütünlüğü düzelmeye başlamıştır, ayrıca hasarlı sinir hücresi sayısının da ciddi derecede az olduğu görülmektedir. Grup S ve Grup A'da hasarlı sinir hücresi sayısı oldukça azdır ve Schwan hücre sayısı diğer gruplara göre belirgin şekilde fazladır (Resim 6).



Kırmızı ok: Schwann hücresi, Siyah ok: hasarlı sinir hücresi ve aksonları göstermektedir.

Resim 6. Grup S, A, I-R ve I-R/A'ya ait siyatik sinir hematoxilen-eozin preparatları, 200X 50 scala bar.

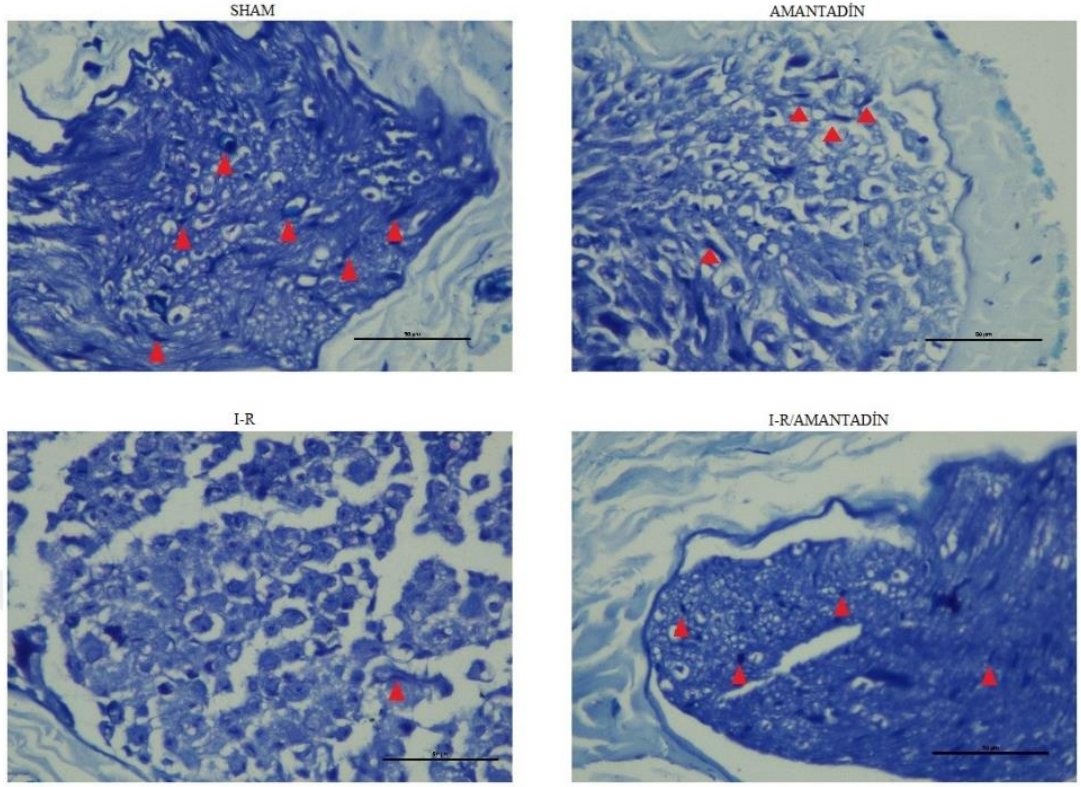
Hematoxilen-eozin boyama ile değerlendirilen beyin korteksinde Grup S ve Grup A'da sağlıklı nöronlar göze çarpmaktadır, Grup A'da belirgin kan damarları göze çarpmaktadır. Grup I-R'de ise yoğun kanama alanları ve hasarlı nöronlar saptandı. Grup I-R/A'da kanama alanları ve hasarlı nöronların sayısının Grup I-R/A'ya göre az olduğu saptandı. (Resim 7)



Kırmızı ok: Sağlıklı nöron, kırmızı yıldız: kan damarı, sarı ok: kanama alanları, siyah ok: hasarlı nöronlar.

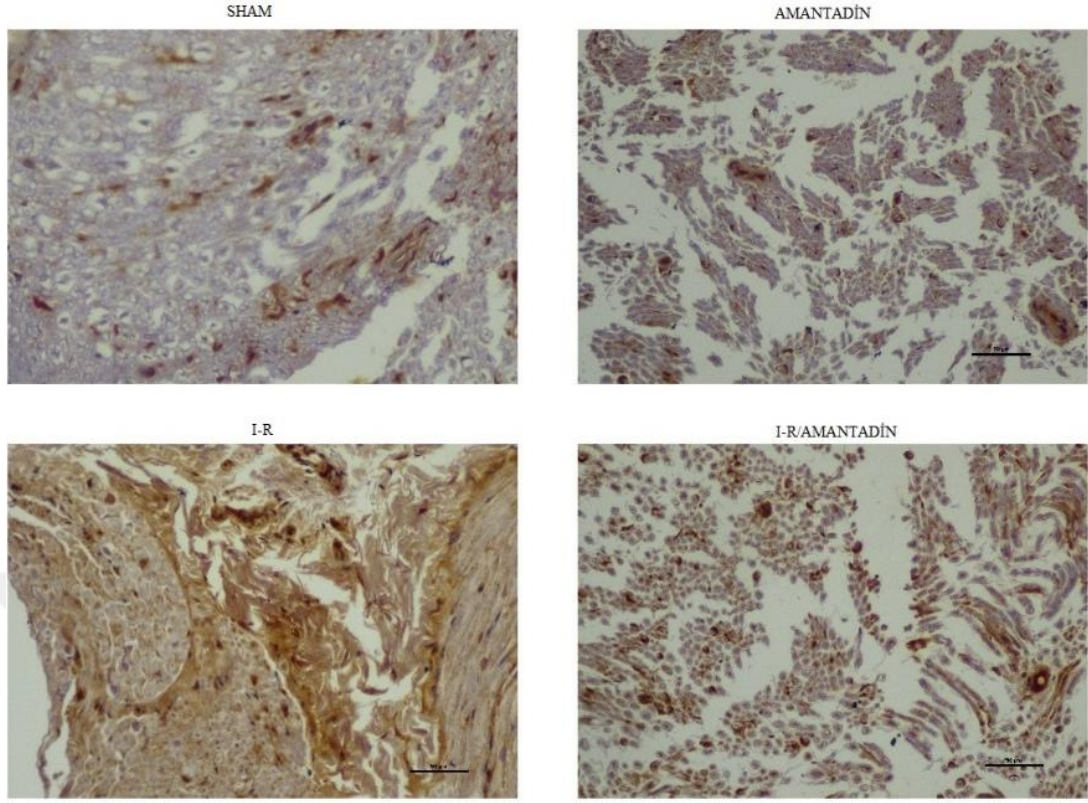
Resim 7. Grup S, Grup A, Grup I-R ve Grup I-R/A'ya ait beyin korteks bölgesi Hematoksilen-eozin preparatları karşılaştırılması. 200X ve 50 scala bar.

Toluidine mavisi ile boyamada grupların Schwann hücre dağılımları resim 8'de görülmektedir. Grup I-R'de Schwann hücreleri Grup S'ye göre oldukça az sayıda saptandı. Grup I-R/A da ise Schwann hücre sayıları Grup S'ye göre az olsa da Grup I-R'ye göre fazla olduğu saptandı (Resim 8).



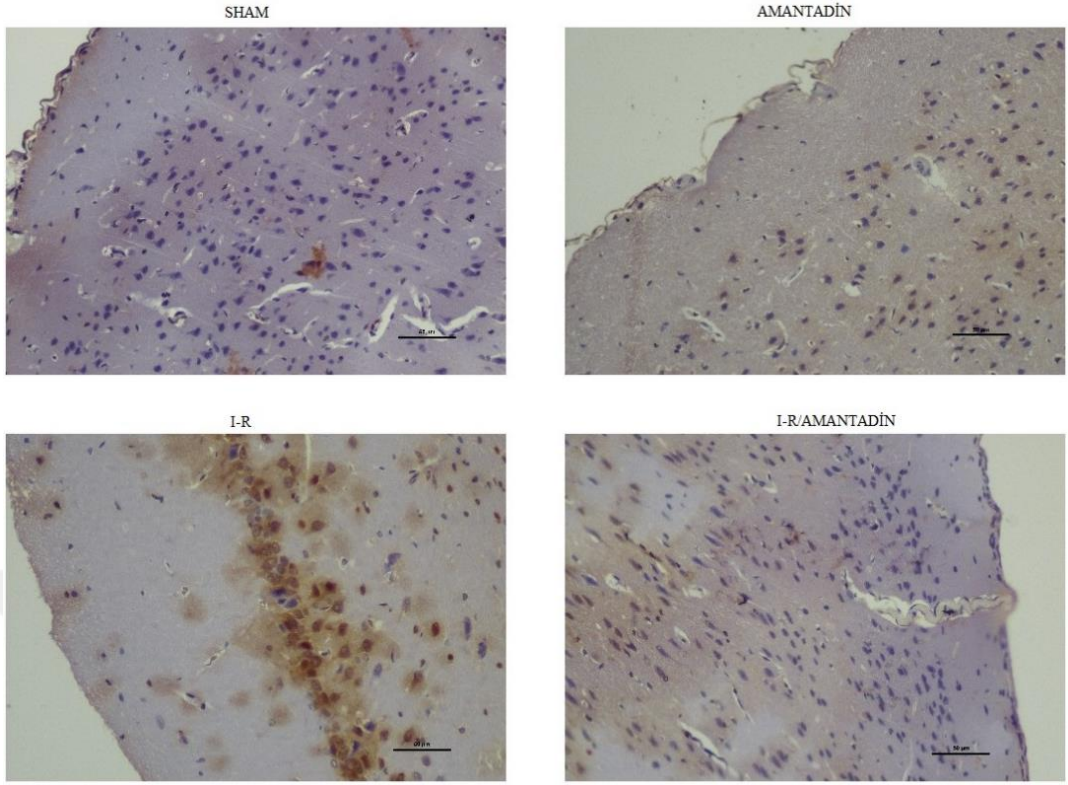
Kırmızı ok: Schwann hücreleri

Resim 8. Çalışma gruplarının Toluidine blue preparatları,400x büyütme 50 scala bar. Siyatik sinirin kaspaz-3 ile boyaması Resim 9 'da görülmektedir. Kaspaz -3 boyanma yoğunluğunun Grup I-R'de en fazla olduğu saptandı. Grup I-R/A'da ise kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun Grup I-R'ye göre daha az olduğu saptandı. Boyanma yoğunluğu en az olan Grup S, daha sonra Grup A olduğu saptandı. Grup A ile Grup S'nin yoğunluğunun birbirine yakın olduğu saptandı (Resim 9).



Resim 9. Sham, Amantadin, I-R VE I-R/A gruplarına ait siyatik sinir kaspaz-3 IHC boyanması karşılaştırılmakta. 200X büyütme 50 scala bar.

Ratların beyin korteksi immunohistokimyasal olarak boyanıp değerlendirildiğinde ise kaspaz-3 yoğunluğu en fazla olan, dolayısı ile nöronları en fazla hasar gören grubun Grup I-R olduğu saptandı (Resim 10). Grup I-R/A'da ise kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun Grup I-R'ye göre daha az olduğu saptandı. Boyanma yoğunluğu en az olan yani, nöron hasarı en az olan ise Grup S ve daha sonra Grup A olduğu saptandı (Resim 10).



Resim 10. Sham, Amantadin, I-R VE I-R/A gruplarına ait beyin korteksinin kaspaz-3 IHC boyanması karşılaştırılmakta. 200X büyütme 50 scala bar.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda ratlarda alt ekstremitte İ-R uygulaması sonrasında santral ve periferik sinirlerde Schwann hücre sayısında azalma, miyelinizasyon ve akson hasarı olduğu saptandı. İ-R uygulaması öncesi amantadin uygulanan ratlarda ise Schwann hücre sayısında azalmanın hafiflediği, miyelinizasyon hasarı ve akson hasarının azaldığı saptandı. Bu bulgular amantadin ile İ-R uygulamasının sinirlerde oluşturduğu hasarın iyileştiğini düşündürmektedir.

Travmatik beyin hasarı ve nörolojik hastalıkların hem tanısında hem de tedavisinin takibinde biyobelirteçlerin kullanımı önemli yer tutmaktadır (Mrozek et al. 2014) Apo A1 negatif inflamatuvar bir biyobelirteçtir ve beyin omurilik sıvısında bol miktarda bulunmaktadır (Bazarian et al. 2013, Sengupta et al. 2016) Nöronal hasar mevcudiyetinde Apo A1 aktin polimerizasyonunu, miyelinizasyon ve remiyelinizasyonu aktive ederek ve nöronal hasardan sonraki inflamatuvar yanıtları baskılayarak etki göstermektedir (Sengupta et al. 2016). Bazarian ve arkadaşları (2013) travmatik beyin hasarı gelişmiş hastalarda kontrol grubu hastalara göre Apo A1 düzeylerinin daha düşük saptandığını raporlamışlardır. Travmatik spinal kord hasarında Apo A1 ve HDL düzeylerinin düştüğü bildirilmiştir (Maimoun et al. 2004). İnflamatuvar süreçte TNF- α ve IL-6 bir akut faz proteini olan serum amiloid A'nın üretimini artırmaktadır (Cabana et al. 1989). Serum amiloid A ile HDL'nin güçlü bir etkileşimi vardır. İnflamasyon durumunda Apo A1, Serum amiloid A uyarısı ile HDL nin yapısından ayrılır ve düzeyi azalır (Cabana et al. 1989). Bu olaylar travmatik kord hasarından sonra Apo A1 seviyesindeki değişimi özetlemektedir. Bizim çalışmamızda ortalama Apo A1 düzeyleri İ-R hasarında en yüksek olarak bulunurken amantadin uygulaması ile kontrol grubundan daha yüksek olsa da İ-R hasarı olan gruptan daha düşük ortalama Apo A1 düzeyleri bulundu. Bununla birlikte tüm bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

BNP, natriüretik hormonlardan biri olarak sınıflandırılan peptid yapılı bir bileşiktir. BNP, sodyum atılımını indükleyerek güçlü bir natriüretik, diüretik ve vazodilatör görevi görür ve böylece sodyum ile su homeostazının ve kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunur. (DeVito 2014, Hodes and Lichtstein 2014) Bu sistemik etkilere ek olarak serebral kan akımını düşürücü etkisi vardır ve akut beyin hasarı durumunda plazmada seviyeleri yükselir (Sviri et al. 2006). Yapılan çalışmalarda BNP'nin, hasar durumunda beynin tepkisine yönelik endojen bir mekanizmanın parçası olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece plazma BNP seviyeleri inme hastalarında olayın ciddiyetini belirlemede ve klinik takibinde kullanılabilir (Gonick ve Buckalew 2015). Yüksek BNP seviyeleri, travma ve inme hastalarında kötü bir klinikle ilişkilidir ve akut iskemik inmenin ciddiyetini ve enfarktüs alanının genişliğini yansıtan yararlı bir biyobelirteç olabilir (Sviri et al. 2006, Montaner et al. 2012). Modrego ve arkadaşları yaptıkları çalışmada plazma BNP seviyelerinin iskemik veya hemorajik beyin ödemi patofizyolojisi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Modrego et al. 2008). Abdel-Rahman ve arkadaşları (2020) yaptıkları deneysel beyin İ-R modelinde safran'ın nöroprotektif etkisini değerlendirmiş ve BNP değerlerinin İ-R grubunda yüksek olup, safran verilen ratlarda daha düşük olduğunu görmüşlerdir. BNP seviyelerinin düşük olması ile de safranın nöroproteksiyon sağladığı sonucuna varmışlardır. Deneysel subaraknoid kanama (SAK) modelinde 12. saat BNP düzeyleri kontrol grubu ve SAK grubundaki ratlarda benzer olarak kaydedilmiştir (Kojima et al. 2005) Lee ve arkadaşları travmatik beyin hasarının kalp üzerine etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmalarında hem kontrol grubunda hem de travmatik beyin hasarı oluşturulan grupta 1, 4, 7 ve 14. günlerde BNP düzeylerinin benzer olduğunu raporlamışlardır. (Lee et al. 2020). Bizim çalışmamızda ortalama BNP düzeyleri İ-R hasarında en düşük olarak bulunurken amantadin uygulaması İ-R hasarı olan gruptan daha yüksek bulundu. Bununla birlikte tüm bu değişkenler anlamlı değildi.

NSE, santral ve periferik nöronlardaki glikolitik enolaz izoenziminden biridir. NSE, iskemi, hipoksi, çeşitli metabolik, inflamatuvar, proliferatif, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Bae et al. 2012, Hafner et al. 2012, Sawhney et al. 2015). Nöronal bir hücre hasarlandığında NSE yapısı bozulmuş olan

hücre zarından geçerek ekstraselüler alana geçer. Normal şartlarda BOS'ta ve plazmada düşük seviyelerde bulunan NSE düzeyi serebrovasküler olaylarda artar (Hay et al. 1984, Steinberg et al. 1984). Serebrovasküler olay sonrasında BOS örneklemek pratik bir yöntem olmayacağından plazma NSE seviyesi ölçümünün daha pratik bir yöntem olduğu kabul edilmiştir (Cunningham et al. 1991). İskemik inme hastalarında serebral nöronal hasarın ilk haftalarında plazma NSE düzeylerinde artış olduğu görülmüş ve iskemik serebrovasküler olaylarda iskemik hasarın kantitatif bir belirleyicisi olarak kullanılabileceği söylenmiştir (Cunningham et al. 1996, Wunderlich et al. 1999). Cao ve arkadaşları (2008) spinal kord hasarı oluşturdukları hayvan modelinde NSE değerlerinin plazma ve BOS'ta yüksek saptandığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ortalama NSE düzeyleri İ-R hasarında en yüksek olarak bulunurken amantadin uygulaması ile İ-R hasarı olan gruptan daha düşük bulundu. Bununla birlikte tüm bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Kan akışının iskemik bir dokuya yeniden yönlendirilmesinden kaynaklanan iskemi-reperfüzyon, hem iskemiye direk maruz kalan organı hem de akciğer, karaciğer, bağırsak, kalp ve ince barsak gibi uzak organları içerecek şekilde bir hasar meydana getirir ki nihayetinde çoklu organ yetmezliğine neden olur. Alt ekstremitte İ-R hasarının uzak organ disfonksiyonlarını indüklediği bilinmektedir (Chang et al. 2016, Gökalp ve ark. 2020, Özdemirkan ve ark. 2021) Çeşitli alt ekstremitte İ-R modellerinde uzak organ olarak akciğerlerde oluşan hasar histopatolojik olarak kanıtlanmıştır (Takhtfooladi et al. 2006, Sun et al. 2007). Kartal ve ark., yaptıkları alt ekstremitte İ-R hasarının karaciğer üzerine olan olumsuz etkilerine deksmedetomidinin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; serumda karaciğer spesifik biyomarkırların İ-R uygulamasından sonra yükseldiğini, deksmedetomidin tedavisi ile bu serum biyomarker düzeylerinin anlamlı olarak düştüğünü saptamışlardır. İmmunohistokimyasal incelemede kaspaz-3 pozitifliğinin İ-R hasarı grubunda daha fazla olduğunu, deksmedetomidin uygulanan grupta anlamlı şekilde kaspaz-3 pozitifliğinin azaldığını raporlamışlardır. Yine histopatolojik olarak İ-R uygulanan grupta oluşan hasarın deksmedetomidin ile azaldığını kanıtlamışlardır. Yazarlar bu sonuçları ile alt ekstremitte İ-R hasarının

karaciğer üzerinde olan olumsuz etkilerine karşı deksmedetomidinin koruyucu etkiye sahip olduğunu raporlamışlardır (Kartal ve ark. 2021) Chen ve arkadaşları (2021) deneysel spinal kord hasarı modelinde kaspaz-3 düzeylerinin hasara paralel olarak yükseldiğini göstermişlerdir. Timokinin ve alfatokoferolün alt ekstremitelerde İ-R hasarının siyatik sinir ve femoral kas üzerine olumsuz etkilerine karşı koruyuculuğunun araştırıldığı bir deneysel çalışmada, immunhistokimyasal olarak İ-R hasarında kaspaz-3 pozitifliğinin arttığı ve ilaç uygulaması ile kaspaz-3 pozitifliğinin ve histopatolojik hasarın anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Erkut ve ark. 2016). Karabağ ve Koçarslan yaptıkları deneysel alt ekstremitelerde İ-R hasarı çalışmalarında; İ-R sonrasında beyinde oluşan hasarın timokinin ve silimarin uygulanması ile histopatolojik olarak azaldığını ve her iki ilacın da beyin üzerine koruyucu etkilerinin olduğunu saptamışlardır (Karabağ ve ark. 2020). Bizim çalışmamızda da İ-R sonrasında kaspaz-3 düzeylerinin ve histopatolojik hasarın hem beyin dokusunda hem de siyatik sinirde arttığı, amantadin uygulaması ile kaspaz-3 düzeylerinde ve histopatolojik hasarda azalma tespit edilmiştir.

Nöroproteksiyon sağlayan farmakolojik yöntemler ile beyin dokusunda oluşmuş olan hasar azaltılabilmektedir, fonksiyonel nörodefisitler iyileşebilmektedir (Saniova et al. 2004). Glutamat eksitator etkili bir nörotransmitterdir ve kafa travmasından hemen sonra yüksek düzeylerde ölçülmüştür. Travmatik beyin hasarı sonrasında NMDA reseptör aktivasyonunun arttığı görülmüştür (Yamamoto et al. 1999); ki bu durumun nöron harabiyetine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. NMDA reseptör antagonistlerinin bu yolla nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (McIntosh et al. 1998). Deneysel çalışmalarda NMDA antagonistlerinin, oksidan etkiyi azaltıp antioksidan aktiviteyi artırarak çeşitli organ ve dokularda İ-R hasarına karşı koruyucu etki gösterdikleri gösterilmiştir (Camara-Lemarroy et al. 2009, Özdemir ve ark. 2013,) Deneysel çalışmalarda NMDA reseptör antagonisti olan memantin ve ketaminin İ-R hasarı sonrasında çeşitli dokularda oluşan hasara karşı koruyucu olduğu raporlanmıştır (Görgülü ve ark. 2000, Kato and Foex 2002, Lee et al. 2004, Himmelseher and Durieux 2005, Li et al. 2018). Deneysel status epilepticus ve serebral iskemi modellerinde NMDA reseptörlerine antagonistik etkisiyle ketaminin nöroproteksiyon sağladığı raporlanmıştır (Fujikawa et al 1995, Hoffman et al. 1992).

Erdö ve Schafer yaptıkları rat kortikal hücre kültürü çalışmasında memantin NMDA reseptörü antagonistik etkisi ile nöroprotektif olduğunu bildirmişlerdir (Erdö and Schafer 1991). Chen ve arkadaşları (1992) yaptıkları çalışmada rat kortikal nöron ve retinal ganglion hücre kültürlerinde NMDA reseptör ilişkili nörotoksosite oluşturmuşlar ve memantin bu nörotoksik hasarı önlediğini kanıtlamışlardır. Kafa travmasından sonra ilk saatlerde beyin omurilik sıvısında dopamin seviyeleri azalmaktadır (Meythaler et al. 2002); ki bu da uyanmada gecikme ve nörolojik defisitle ilişkilendirilmiştir (Napolitano et al. 2005). Dopaminin salınımını arttırarak veya re-uptake'ini inhibe ederek etki gösteren dopaminerjik etkili ilaçlar, retiküler aktive edici sistem üzerinde stimüle edici etkiye yol açarak uyanıklık ve dikkati sağlamada iyileşmeye yol açarlar (Cossu 2014). Amantadin hem NMDA reseptör antagonist etkiye hem de direk olarak dopaminerjik agonistik etkiye sahiptir ve bu özellikleriyle nöroproteksiyon sağlamaktadır (Meythaler et al. 2002, Giacino JT et al 2012). Deneysel hayvan çalışmalarında amantadinin travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkileri kanıtlanmıştır (Wang et al. 2014, Okigbo et al. 2019). Xiao ve arkadaşları (2017) yaptıkları deneysel modelde amantadinin hipokampal kesitlerde kortikosteron ile indüklenen CA3-CA1 yolağının anormal glutamaterjik sinaptik iletiminde oksidatif stresi azalttığı ve bunu antioksidan özellikteki enzim aktivitelerini düzenleyerek yaptığı ve böylece nöroprotektif etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Amantadinin bu etkiyi hücre içine Ca^{+2} girişini azaltarak ve apoptozisi önleyerek yaptığını öne sürmüşlerdir. Lustig ve arkadaşları (1992) ise yaptıkları benzer bir çalışmada rat kortikal nöron hücre kültüründe amantadinin NMDA reseptör ilişkili nöroprotektif etkisini göstermişlerdir. Doğan ve Karaca deneysel spinal kord hasarı oluşturdukları ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında amantadinin spinal kod hasarında oksidatif stres cevabı azaltarak, anjiyogenezi indükleyerek, inflamasyonu ve apoptozisi etkileyerek nöroprotektif etkiye sahip olabileceğini bildirmişlerdir (Doğan ve Karaca 2020). Karşıt olarak, serebral İ-R hasarı oluşturulan başka bir deneysel çalışmada ise amantadinin akut dönemde apoptozis üzerine etkisinin olmadığı kaydedilmiştir (Gündüz ve ark. 2021). Orhan ve arkadaşları (2021) yaptıkları deneysel alt ekstremite İ-R modelinde uzak organ olarak akciğerlerde oluşan hasarın amantadin uygulaması ile histopatolojik olarak düzeldiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda alt ekstremiteye İ-R uygulandıktan

sonra santral ve periferik sinir hücrelerinde hasar olduğu immunohistokimyasal ve histopatolojik olarak gösterildi. Amantadin tedavisi ile oluşan bu hasarın immunohistokimyasal ve histopatolojik olarak azaldığının gösterilmesi bize amantadinin nöroprotektif etkinliğini düşündürmektedir.

İnfrarenal abdominal aortaya klempe konularak oluşturduğumuz 240 dakikalık alt ekstremitte İ-R hasarı modelinde; beyin ve siyatik sinir hücrelerinin alt ekstremitte İ-R hasarında immunohistokimyasal ve histopatolojik olarak olumsuz etkilendiği Schwann hücre sayısında azalma, myelinizasyon ve akson hasarı ile saptandı. Oluşan hasar 45mg/kg dozda uygulanan amantadin ile azalmaktadır. Sonuç olarak bir NMDA reseptör antagonisti ve dopamin reseptörlerine agonistik etkili olan amantadin alt ekstremitte İ-R hasarının santral ve periferik sinir sistemi hücrelerine olan olumsuz etkilerine karşı nöroprotektif özellik göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman RF, El Awdan SA, Hegazy RR, Mansour DF, Ogaly HA, Abdelbaset M. (2020). Neuroprotective effect of Crocus sativus against cerebral ischemia in rats. *Metab Brain Dis.* 35(3):427-439.
- Adrain C, Martin SJ. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 26(6):390-397.
- Aksoy Y. (2002) Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.* 22: 442- 448.
- Aksu NM, Şenlikçi H, Akkaş M, Özmen MM. (2013). The Neurological Improvement of a Patient after Amantadine Infusion . *Journal of Emergency Medicine Case Reports* , 4 (4) , 161-163 .
- Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. (2006). Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 31; 51–56.
- Bae S, Kim H, Lee N, Won C, Kim HR, Hwang YI, Song YW, Kang JS, Lee WJ. (2012). α -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(1), 365–372.
- Bazarian JJ, Blyth BJ, He H, Mookerjee S, Jones C, Kiechle K, Moynihan R, Wojcik SM, Grant WD, Secreti LM, Triner W, Moscatti R, Leinhart A, Ellis GL, Khan J. (2013). Classification accuracy of serum Apo A-I and S100B for the diagnosis of mild traumatic brain injury and prediction of abnormal initial head computed tomography scan. *Journal of neurotrauma*, 30(20), 1747–1754.

- Berendes E, Walter M, Cullen P, Prien T, Van Aken H, Horsthemke J, Schulte M, von Wild K, Scherer R. (1997). Secretion of brain natriuretic peptide in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet (London, England)*, 349(9047), 245–249.
- Bilal M, Sariođlu T. (1992). İskemik miyokard injurisi ve intraoperatif miyokard korunmasına genel bir bakış. *GKD Cer Derg* 1: 118-126.
- Boast CA, Gerhardt SC, Pastor G, Lehmann J, Etienne PE, Liebman JM. (1988). The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. *Brain research*, 442(2), 345–348.
- Buerke M, Murohara T, Lefer AM. (1995). Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 91: 393-402.
- Buja LM. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*. JulAug;14(4):170-5.
- Cabana VG, Siegel JN, Sabesin SM. (1989). Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *Journal of lipid research*, 30(1), 39–49.
- Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. (2009) The effects of NMDA receptor antagonists over intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology* 621: 78–85
- Cámara-Lemarroy CR., Guzmán-de la Garza FJ, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. (2009). Effect of sulfasalazine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Renal failure*, 31(9), 822–828.
- Cantürk NZ, Sayek İ. (2005) Cerrahi araştırma kitabı. Nobel tıp kitabevleri.
- Cao F, Yang XF, Liu WG, Hu WW, Li G, Zheng XJ, Shen F, Zhao XQ, Lv ST. (2008). Elevation of neuron-specific enolase and S-100beta protein level in

- experimental acute spinal cord injury. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 15(5), 541–544.
- Carden DL, Granger DN. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. Feb;190(3):255-66.
- Chan TS, Cassim S, Raymond VA, Gottschalk S, Merlen G, Zwingmann C, Bilodeau M. (2018). Upregulation of Krebs cycle and anaerobic glycolysis activity early after onset of liver ischemia. *Plos One*, 13(6), e0199177
- Chandler MC, Barnhill JL, Gualtieri CT. (1988). Amantadine for the agitated head-injury patient. *Brain Injury*, 2(4), 309–311.
- Chang YK, Huang SC, Kao MC, Huang CJ. (2016). Cepharanthine alleviates liver injury in a rodent model of limb ischemia-reperfusion. *Acta anaesthesiologica Taiwanica : official journal of the Taiwan Society of Anesthesiologists*, 54(1), 11–15.
- Chen F, Han J, Wang D. (2021). Identification of key microRNAs and the underlying molecular mechanism in spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *PeerJ*, 9, e11454.
- Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA. (1992). Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(11), 4427–4436.
- Collard CD, Gelman S. (2001). Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94(6), 1133–1138.
- Cossu G. (2014). Therapeutic options to enhance coma arousal after traumatic brain injury: State of the art of current treatments to improve coma recovery. *British Journal of Neurosurgery*, 28, 187-198.

- Crack PJ, Taylor JM. (2005). Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free radical biology & medicine*, 38(11), 1433–1444.
- Cunningham RT, Watt M, Winder J, McKinstry S, Lawson JT, Johnston CF, Hawkins SA, Buchanan KD. (1996). Serum neurone-specific enolase as an indicator of stroke volume. *European journal of clinical investigation*, 26(4), 298–303.
- Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1–105.
- Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. (1997). Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 21(4):455-468.
- de Bold AJ. (2009). Cardiac natriuretic peptides gene expression and secretion in inflammation. *Journal Of Investigative Medicine*. 57(1), 29–32.
- De Vito P. (2014). Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine?. *Peptides*, 58, 108–116.
- Dick F, Li J, Giraud MN, Kalka C, Schmidli J, Tevaearai H. (2008). Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation*, 118(19), 1920–1928.
- Doğan G, Karaca O. (2020). N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists may Ameliorate Spinal Cord Injury by Inhibiting Oxidative Stress: An Experimental Study in Rats. *Turkish neurosurgery*, 30(1), 60–68.
- Dröge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Dündar Y. (2000) Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar: Afyon Kocatepe Üniversitesi
- Elliott DA, Weickert CS, Garner B (2010) Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol* 51(4):555–573.

- Eltzschig HK, Collard CD. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 70: 71-86.
- Erdö SL, Schäfer M. (1991). Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *European Journal of Pharmacology*, 198(2-3), 215–217.
- Ergün R, Bostancı U, Akdemir G, Beşkonaklı E, Kaptanoğlu E, Gürsoy F, Taşkın Y. (1998). Prognostic value of serum neuron-specific enolase levels after head injury. *Neurological research*, 20(5), 418–420.
- Erkut A, Cure MC, Kalkan Y, Balık MS, Güvercin Y, Yaprak E, Yüce S, Şehitoglu I, Cure E. (2016). Protective effects of thymoquinone and alpha-tocopherol on the sciatic nerve and femoral muscle due to lower limb ischemia-reperfusion injury. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(6), 1192–1202.
- Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. (2001) Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001,2;4: 154-167.
- Faden AI, Ellison JA, Noble LJ. (1990). Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spinal cord injury. *European journal of pharmacology*, 175(2), 165–174
- Faden AI, Lemke M, Simon RP, Noble LJ. (1988). N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *Journal of neurotrauma*, 5(1), 33–45.
- Farnebo LO, Fuxe K, Goldstein M, Hamberger B, Ungerstedt U. (1971). Dopamine and noradrenaline releasing action of amantadine in the central and peripheral nervous system: a possible mode of action in Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol*. 16(1):27-38.

- Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. (2015). Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handbook of experimental pharmacology*, 224, 181–206.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409(6818):341–346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23(4):1416–1423
- Fujikawa DG. (1995). Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia*, 36(2), 186–195.
- Gao Y, Ma L, Liang F, Zhang Y, Yang L, Liu X, Yang J. (2020). The use of amantadine in patients with unresponsive wakefulness syndrome after severe cerebral hemorrhage. *Brain Injury*, 1–5.
- Garcia JH, Anderson ML. (1989). Physiopathology of cerebral ischemia. *Critical reviews in neurobiology*, 4(4), 303–324.
- Giacino JT, Whyte J, Bagiella E, Kalmar K, Childs N, Khademi A, Eifert B, Long D, Katz DI, Cho S, Yablon SA, Luther M, Hammond FM, Nordenbo A, Novak P, Mercer W, Maurer-Karattup P, Sherer M. (2012). Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. *The New England journal of medicine*, 366(9), 819–826.
- Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. (2012). The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*, 43(6), 670–675.
- Ginsberg MD. (2003). Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*, 34(1), 214–223.
- Girotti AW. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39: 1529-1542.

- Glatzounis GK, Salacinski H, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. (2005). The Contemporary Role of Antioxidant Therapy in Attenuating Liver Ischemia Reperfusion Injury: A Review. *Liver Transpl.* 11:1031-1047.
- Gökalp O, Eygi B, Gökalp G, Kıray M, Beşir Y, Işcan S, Güvendi G, Yeşilkaya NK, İner H, Yılık L, Gürbüz A. (2020). Which Distant Organ is Most Affected by Lower Extremity Ischemia-Reperfusion?. *Annals of vascular surgery*, 65, 271–281.
- Gonick HC, Buckalew VM. (2015). Editorial: Natriuretic Hormones. *Frontiers in endocrinology*, 6, 108.
- Görgülü A, Kınş T, Çobanoğlu S, Ünal F, İzgi NI, Yanık B, Küçük M. (2000). Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta neurochirurgica*, 142(11), 1287–1292.
- Grace PA. (1994). Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal Of Surgery*, 81(5), 637–647.
- Guzmán-de la Garza FJ, Cámara-Lemarroy CR, Ballesteros-Elizondo RG, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. (2010). Ketamine and the myenteric plexus in intestinal ischemia/reperfusion injury. *Digestive Diseases And Sciences*, 55(7), 1878–1885.
- Gündüz ZB, Aktas F, Vatansev H, Solmaz M, Erdoğan E. (2021). Effects of amantadine and topiramate on neuronal damage in rats with experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Advances in clinical and experimental medicine*. 30(10), 1013–1023.
- Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R, Kos J. (2013). Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging cell*, 12(4), 604–614.

- Hafner A, Obermajer N, Kos J. (2012). γ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *The Biochemical journal*, 443(2), 439–450.
- Halliwell B, Gutteridge JM. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 280(1), 1–8.
- Happel RD, Smith KP, Banik NL, Powers JM, Hogan EL, Balentine JD. (1981). Ca^{2+} -accumulation in experimental spinal cord trauma. *Brain research*, 211(2), 476–479.
- Hay E, Royds JA, Davies-Jones GA, Lewtas NA, Timperley WR, Taylor CB. (1984). Cerebrospinal fluid enolase in stroke. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 47(7), 724–729.
- Hegele RA (2009) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* 10(2):109–121.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1456–1462.
- Himmelseher S, Durieux ME. (2005). Revising a Dogma: Ketamine for Patients with Neurological Injury? *Anesthesia & Analgesia*, 101(2), 524-534.
- Hirota K, Lambert DG. (1996). Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *British journal of anaesthesia*, 77(4), 441–444.
- Hodes A, Lichtstein D (2014) Natriuretic hormones in brain function. *Front Endocrinol* 5:201.
- Hoffman WE, Pelligrino D, Werner C, Kochs E, Albrecht RF, am Esch JS. (1992). Ketamine Decreases Plasma Catecholamines and Improves Outcome from Incomplete Cerebral Ischemia in Rats. *Anesthesiology*, 76(5), 755–762.

- Hubsher G, Haider M, Okun MS. (2012). Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology*. 78(14): 1096-1099.
- İnan M, Uz YH, Kızılay G, Topçu-Tarladaçalısır Y, Sapmaz-Metin M, Akpolat M, Aydogdu N. (2013). Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *Journal of pediatric surgery*, 48(8), 1707–1715.
- Jaeschke H. (2003). Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284: G15–G26.
- James ML, Blessing R, Phillips-Bute BG, Bennett E, Laskowitz DT. (2009). S100B and brain natriuretic peptide predict functional neurological outcome after intracerebral haemorrhage. *Biomarkers*. 14(6), 388–394.
- James ML, Wang H, Venkatraman T, Song P, Lascola CD, Laskowitz DT. (2010). Brain natriuretic peptide improves long-term functional recovery after acute CNS injury in mice. *Journal of neurotrauma*, 27(1), 217–228.
- Jennings RB, Reimer KA. (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 42: 225-246
- Johnsson P, Blomquist S, Lührs C, Malmkvist G, Alling C, Solem JO, Ståhl E. (2000). Neuron-specific enolase increases in plasma during and immediately after extracorporeal circulation. *The Annals of thoracic surgery*, 69(3), 750–754.
- Kalani R, Krishnamoorthy S, Deepa D, Gopala S, Prabhakaran D, Tirschwell D, Sylaja PN. (2020). Apolipoproteins B and A1 in Ischemic Stroke Subtypes. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 29(4), 104670.
- Kao MC, Jan WC, Tsai PS, Wang TY., & Huang, C. J. (2011). Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats. *The Journal of surgical research*, 171(1), e97–e106.

- Karabağ H, Koçarslan S. (2020). Comparison of the effects of thymoquinone and silymarin on the brain of rats having ischemia-reperfusion in the lower extremities. *Annali italiani di chirurgia*, 91, 131–136.
- Kartal S, Şen A, Tümkaya L, Erdivanlı B, Mercantepe T, Yılmaz A. (2021). The effect of dexmedetomidine on liver injury secondary to lower extremity ischemia-reperfusion in a diabetic rat model. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, 43(7), 677–682.
- Kato R, Foëx P. (2002). Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: An update for anesthesiologists. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien D'anesthésie*, 49(8), 777–791.
- Kirchhoff C, Stegmaier J, Bogner V, Buhmann S, Mussack T, Kreimeier U, Mutschler W, Biberthaler P. (2006). Intrathecal and systemic concentration of NT-proBNP in patients with severe traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 23(6), 943–949.
- Kirino T, Tamura A, Sano K. (1985). Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia--reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in brain research*, 63, 39–58.
- Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzık L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1988). Lower Torso Ischemia-Induced Lung Injury Is Leukocyte Dependent. *Annals of Surgery*, 208(6), 761–767.
- Koenig MA, Puttgen HA, Prabhakaran V, Reich D, Stevens RD. (2007). B-type natriuretic peptide as a marker for heart failure in patients with acute stroke. *Intensive care medicine*, 33(9), 1587–1593.
- Kojima J, Katayama Y, Moro N, Kawai H, Yoneko M, Mori T. (2005). Cerebral salt wasting in subarachnoid hemorrhage rats: model, mechanism, and tool. *Life Sci*. 2005;76(20):2361-2370.

- Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K, Riederer P. (1994). Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 43, 91–104.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Temel Patoloji, 8. Baskı Türkçe Çevirisi, Çevikbaş U (ed), Nobel Tıp Kitabevi, 2007; s: 13-19.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. (2017) Robbins Basic Pathology E-Book: Elsevier Health Sciences
- Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA, Halter S, Wikswo JP. Jr, Richards WO. (2003). Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West African journal of medicine*, 22(1), 59–62.
- Lee HT, Ota-Setlik A, Fu Y, Nasr SH, Emala CW. (2004). Differential Protective Effects of Volatile Anesthetics against Renal Ischemia–Reperfusion Injury In Vivo. *Anesthesiology*, 101(6), 1313–1324.
- Lee YL, Lim SW, Zheng HX, Chang WT, Nyam TE, Chio CC, Kuo JR, Wang CC. (2020). The Short-Term Effects of Isolated Traumatic Brain Injury on the Heart in Experimental Healthy Rats. *Neurocritical care*, 33(2), 438–448.
- Levin ER, Gardner DG, Samson WK. (1998). Natriuretic peptides. *The New England journal of medicine*, 339(5), 321–328.
- Li X, Wang J, Song X, Wu H, Guo P, Jin Z, Wang C, Tang C, Wang Y, Zhang Z. (2018). Ketamine ameliorates ischemia-reperfusion injury after liver autotransplantation by suppressing activation of Kupffer cells in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(9), 886–892.
- Liao SL, Chen WY, Raung SL, Kuo JS, Chen CJ. (2001). Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Neuroreport*, 12(9), 1943–1947.

- Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. (1996). Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 61: 469-472.
- Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. (2005). Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 18(6), 335–350.
- Lustig HS, Ahern, KV, Greenberg DA. (1992). Antiparkinsonian drugs and in vitro excitotoxicity. *Brain research*, 597(1), 148–150.
- Maïmoun L, Puech AM, Manetta J, Badiou S, Paris F, Ohanna F, Rossi M, Sultan C. (2004). Circulating leptin concentrations can be used as a surrogate marker of fat mass in acute spinal cord injury patients. *Metabolism: clinical and experimental*, 53(8), 989–994.
- McGirt MJ, Blessing R, Nimjee SM, Friedman AH, Alexander MJ, Laskowitz DT, Lynch JR. (2004). Correlation of serum brain natriuretic peptide with hyponatremia and delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 54(6), 1369–1374.
- McIntosh TK, Juhler M, ve Wieloch T. (1998), Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 15, 731-769.
- Merkulova T, Dehaupas M, Nevers MC, Créminon C, Alameddine H, Keller A. (2000). Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle. *European journal of biochemistry*, 267(12), 3735–3743.
- Metman LV, Del Dotto P, LePoole K, Konitsiotis S, Fang J, Chase TN. (1995). Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. *Arch Neurol*. 56(11):1383-1386.
- Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM Jr, Yaksh TL. (1986). Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion, electroencephalography, and histology in severe

and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 6(1), 71–78.

Meythaler JM, Brunner RC, Johnson A, Novack TA. (2002). Amantadine to Improve Neurorecovery in Traumatic Brain Injury–Associated Diffuse Axonal Injury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 17(4), 300–313.

Modrego PJ, Boned B, Berlanga JJ, Serrano M. (2008). Plasmatic B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in hyperacute stroke as markers of CT-evidence of brain edema. *International journal of medical sciences*, 5(1), 18–23.

Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. (2008). Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research*, 147(1), 153–159.

Montaner J, García-Berrocoso T, Mendioroz M, Palacios M, Perea-Gainza M, Delgado P, Rosell A, Slevin M, Ribó M, Molina CA, Alvarez-Sabín J. (2012). Brain natriuretic peptide is associated with worsening and mortality in acute stroke patients but adds no prognostic value to clinical predictors of outcome. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 34(3), 240–245.

Moore KA, Sklerov J, Levine B, Jacobs AJ (2001). Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption. *Journal of analytical toxicology*, 25(7), 583-588.

Mrozek S, Dumurgier J, Citerio G, Mebazaa A, Geeraerts T. (2014). Biomarkers and acute brain injuries: interest and limits. *Critical Care*, 18(2), 220.

Nakamura T, Vollmar B, Winning J, Ueda M, Menger MD, Schäfers HJ. (2001). Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *The Annals of thoracic surgery*, 72(4), 1183–1189.

- Napolitano E, Elovic EP, ve Qureshi AI. (2005). Pharmacological stimulant treatment of neurocognitive and functional deficits after traumatic and non-traumatic brain injury . *Med Sci Monit*, 11, 212-220.
- Nofer JR, Remaley AT, Feuerborn R, Wolinnska I, Engel T, von Eckardstein A, Assmann G (2006). Apolipoprotein A-I activates Cdc42 signaling through the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 47(4):794–803.
- Oğuz A. (2010). Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarında Curcuminin Karaciğer Ve Uzak Organ Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Okigbo AA, Helkowski MS, Royes BJ, Bleimeister IH, Lam TR, Bao GC, Cheng JP, Bondi CO, Kline AE. (2019). Dose-dependent neurorestorative effects of amantadine after cortical impact injury. *Neuroscience letters*, 694, 69–73.
- Orhan M, Taş Tuna A, Ünal Y, Arslan M, Yazar H, Sezen ŞC, Gözükara SI, Palabıyık O. (2021). The effects of amantadine on lung tissue in lower limb ischemia/reperfusion injury model in rats. *Türk göğüs kalp damar cerrahisi dergisi*, 29(1), 77–83.
- Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P. (1996). Mechanisms of calcium-related cell death. *Advances in neurology*, 71, 137–151.
- Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostaglandin E1 (PGE1) Kullanımının İncelenmesi: *Deneysel Çalışma. Fırat Tıp Dergisi* 2004; 9(3): 67-71.
- Özdemirkan A, Küçük A, Güneş I, Arslan M, Tuncay A, Sivgin V, Sezen SC, Boyunağa H. (2021). The effect of cerium oxide on lung injury following lower extremity ischemia-reperfusion injury in rats under desflurane anesthesia. *Saudi medical journal*, 42(11), 1247–1251.
- Özsüer H, Görgülü A, Kiriş T, Çobanoğlu S. (2005). The effects of memantine on lipid peroxidation following closed-head trauma in rats. *Neurosurgical review*, 28(2), 143–147.

- Özdemir HH, Demir CF, Berilgen MS, Akgün B, Kuloğlu T, Kapan O, İlhan S, Balduz M. (2013). Protective Effects of Memantine Induced by Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. *Turkish Journal of Neurology* 19: 3
- Parks DA, Williams TK, Beckman JS. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 254(5), G768–G774.
- Piast M, Kustrzeba-Wójcicka I, Matusiewicz M, Banaś T. (2005). Molecular evolution of enolase. *Acta biochimica Polonica*, 52(2), 507–513.
- Powner DJ, Hergenroeder GW, Awili M, Atik MA, Robertson C. (2007). Hyponatremia and comparison of NT-pro-BNP concentrations in blood samples from jugular bulb and arterial sites after traumatic brain injury in adults: a pilot study. *Neurocritical care*, 7(2), 119–123.
- Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. (1999). The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *The American Journal of Surgery*, 178(2), 147–150.
- Rodwell VW, Weil PA, Botham KM, Bender D, Kennelly PJ. (2015) Harpers Illustrated Biochemistry 30th Edition: McGraw-Hill Education
- Salvemini D, Cuzzocrea S. (2002). Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 3(6), 886–895.
- Saniova B, Drobny M, Kneslova L, Minarik M. (2004). The outcome of patients with severe head injuries treated with amantadine sulphate. *Journal of Neural Transmission*, 111(4), 511–514.
- Sawhney S, Hood K, Shaw A, Braithwaite AW, Stubbs R, Hung NA, Royds JA, Slatter TL. (2015). Alpha-enolase is upregulated on the cell surface and responds to plasminogen activation in mice expressing a $\Delta 133p53\alpha$ mimic. *PloS one*, 10(2), e0116270.

- Schmidley JW. (1990). Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*, 21(7), 1086–1090.
- Schoenberg MH, Beger HG. (1993). Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical care medicine*, 21(9), 1376–1386.
- Schwartz-Bloom RD, Sah R. (2001). Gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry*, 77(2), 353–371.
- Selman WR, Crumrine RC, Ricci AJ, LaManna JC, Ratcheson RA, Lust WD. (1990). Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 21(3), 467–471.
- Semenza GL. (2000). Chairman's summary: mechanisms of oxygen homeostasis, circa 1999. *Advances in experimental medicine and biology*, 475, 303–310.
- Sengupta MB, Mukhopadhyay D. (2016). Possible role of apolipoprotein A1 in healing and cell death after neuronal injury. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 8, 460–477.
- Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, Baba S, Nakano M. (1996). Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 23(6), 1656–1663.
- Seyfried D, Han Y, Zheng Z, Day N, Moin K, Rempel S, Sloane B, Chopp M. (1997). Cathepsin B and middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of neurosurgery*, 87(5), 716–723.
- Shimizu A, Suzuki F, Kato K. (1983). Characterization of alpha alpha, beta beta, gamma gamma and alpha gamma human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases (alpha gamma, beta gamma and alpha beta) from homodimeric forms. *Biochimica et biophysica acta*, 748(2), 278–284.

- Shiue CY, Vallabhahosula S, Wolf AP, Dewey SL, Fowler JS, Schlyer DJ, Arnett CD, Zhou YG. (1997). Carbon-11 labelled ketamine-synthesis, distribution in mice and PET studies in baboons. *Nuclear medicine and biology*, 24(2), 145–150.
- Siesjö BK. (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *Journal of neurosurgery*, 77(2), 169–184.
- Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrová J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML. (1995). Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *Journal of neurotrauma*, 12(5), 943–956.
- Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. (2005). Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. *Pharmacological research*, 51(1), 1–17.
- Steinberg R, Gueniau C, Scarna H, Keller A, Worcel M, Pujol JF. (1984). Experimental brain ischemia: neuron-specific enolase level in cerebrospinal fluid as an index of neuronal damage. *Journal of neurochemistry*, 43(1), 19–24.
- Sun XF, Wang LL, Wang JK, Yang J, Zhao H, Wu BY, Wang YF, Wang L. (2007). Effects of simvastatin on lung injury induced by ischaemia-reperfusion of the hind limbs in rats. *The Journal of international medical research*, 35(4), 523–533.
- Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. (1991). Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*. 42: 125-138.
- Sviri GE, Soustiel JF, Zaaroor M (2006) Alteration in brain natriuretic peptide (BNP) plasma concentration following severe traumatic brain injury. *Acta Neurochir* 148:529–533

- Takhtfooladi H, Takhtfooladi M, Moayer F, Mobarakeh S. (2015). Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model. *Revista portuguesa de pneumologia*, 21(1), 30–35.
- Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. (2008). Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. *Journal of Surgical Research*, 150: 304-330.
- Taub PR, Fields JD, Wu AH, Miss JC, Lawton MT, Smith WS, Young WL, Zaroff JG, Ko NU. (2011). Elevated BNP is associated with vasospasm-independent cerebral infarction following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*, 15(1), 13–18.
- Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. (2000). Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi*, 8: 10-16.
- Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. (2007). A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 68: 1363-1370.
- Tomida M, Muraki M, Uemura K, Yamasaki K. (1998). Plasma concentrations of brain natriuretic peptide in patients with subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 29(8), 1584–1587.
- Toyokuni S. (1999). Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*, 49(2), 91–102.
- Tso MM, Blatchford KL, Callado LF, McLaughlin DP, & Stamford JA (2004). Stereoselective effects of ketamine on dopamine, serotonin and noradrenaline release and uptake in rat brain slices. *Neurochemistry international*, 44(1), 1-7.
- Ueda Y, Kitamoto A, Willmore LJ, Kojima T. (2013). Hippocampal gene expression profiling in a rat model of posttraumatic epilepsy reveals temporal

- upregulation of lipid metabolism-related genes. *Neurochemical research*, 38(7), 1399–1406.
- Van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP (2003) Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 31(5):1359–1366.
- Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, van Geel W, de Reus H, Biert J, Verbeek MM. (2004). Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology*, 62(8), 1303–1310.
- Wang T, Huang XJ, Van KC, Went GT, Nguyen JT, Lyeth BG. (2014). Amantadine improves cognitive outcome and increases neuronal survival after fluid percussion traumatic brain injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 31(4), 370–377.
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. (1996). Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 83: 162-170.
- Whittington PF, Alonso EM, Superina RA, Freese DK. (2002). Liver transplantation in children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 35 Suppl 1, S44–S50.
- Wilhelm J. (1990). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 137:1-53.
- Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. (1999). Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke*, 30(6), 1190–1195.
- Xiao X, Zhang H, Wang H, Li Q, Zhang T. (2017). Neuroprotective effect of amantadine on corticosterone-induced abnormal glutamatergic synaptic transmission of CA3-CA1 pathway in rat's hippocampal slices. *Synapse (New York, N.Y.)*, 71(12), 10.1002/syn.22010.

- Yalçın AS. (1998) Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*. 11: 342-6
- Yamamoto T, Rossi S, Stiefel M. (1999), CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients . *Acta Neurochir*, 75 (Suppl), 17-19.
- Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Şimşek, B, Sepici V. (2006). Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian journal of rheumatology*, 35(1), 61–64.
- Yıldar M. (2008). Deneysel Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Splenektomi ve Gadolinium Chloride (GdCl₃)'in Koruyucu Etkisi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi.
- Zakynthinos E, Kiropoulos T, Gourgoulisanis K, Filippatos G. (2008). Diagnostic and prognostic impact of brain natriuretic peptide in cardiac and noncardiac diseases. *Heart & lung : the journal of critical care*, 37(4), 275–285.
- Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. (1999) Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 101:148-160.
- Zhao GJ, Yin K, Fu YC, Tang CK (2012) The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med* 18:149–158.
- Zhao J, Yu S, Tong L, Zhang F, Jiang X, Pan S, Jiang H, Sun X. (2008). Oxymatrine attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Surgery today*, 38(10), 931–937.
- Zimmerman BJ, Granger DN. (1992). Reperfusion Injury. *Surgical Clinics of North America*, 72(1), 65–83.



EKLER

EK 1 : Etik Kurul Onayı

SAKARYA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU ARAŞTIRMA ONAY BELGESİ		
SAKARYA UNIVERSITY ANIMAL EXPERIMENTS LOCAL ETHIC COMMITTEE RESEARCH APPROVAL CERTIFICATE		
Araştırmannın Adı <i>Title of the Research</i>	Alt Ekstremité İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Santral ve Periferik Nöron Hasarına Amantadinin Nöroprotektif Etkisi	
Yürütücü <i>Chief investigator</i>	Dr. Öğr. Üyesi Onur PALABIYIK	
Yrd. Araştırmacı(lar) Co-investigator(s)	Araş. Gör. Melda ÖZTATAR	
Araş. Başlama Tarihi/ <i>Research Starting Date</i>		
Proje Süresi/ <i>Total Time of Project</i>	12 Ay	
Kullanılan Hayvan Türü/ <i>Animal Species</i>	Rat	
Kullanılan Hayvan Cinsiyeti ve Sayısı/ <i>Animal Sex and number</i>	Erkek - 24 adet	
Araş. Destekleyen Kuruluş (varsa) <i>Funding institution(s) (if available)</i>	-	
Destek Şekli ve Miktarı <i>Type and amount of funding</i>	-	
Karar: Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05 / 02 / 2020 tarih ve 10 sayılı kararı ile; yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin <input checked="" type="radio"/> gerçekleştirilmesinin Uygun Olduğuna Karar Verilmiştir. <input type="radio"/> Yeniden düzenlenmesine Karar Verilmiştir. <input type="radio"/> gerçekleştirilmesinin Uygun Olmadığına Karar Verilmiştir.		
Decision: With the decision of the Local Ethics Committee of Animal Experiments of Sakarya University dated 05/02/2020 and numbered 10; it has been decided that above mentioned research project is <input checked="" type="radio"/> Appropriate to carry out. <input type="radio"/> Rearranged <input type="radio"/> Not Appropriate to carry out.		
	BASKAN/CHAIR Prof. Dr. M. Ramazan ŞEKEROĞLU	
ÜYE / MEMBER Prof. Dr. Ali Fuat ERDEM	ÜYE / MEMBER Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÇAKIROĞLU (Veteriner Hekim)	ÜYE / MEMBER Prof. Dr. Pefin TANYERİ
ÜYE / MEMBER Prof. Dr. Kerem KARAMAN	ÜYE / MEMBER Doç. Dr. Hüseyin AKSOY	ÜYE / MEMBER Dr. Öğr. Üyesi Songül DOĞANAY
ÜYE / MEMBER Murat YILDIZKIM	ÜYE / MEMBER Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KARA	ÜYE / MEMBER Dr. Öğr. Üyesi Havva SERT
	ÜYE / MEMBER İbrahim AKTEKİN	



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Melda Öztatar

Doğum yeri ve tarihi:

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu:

İletişim adresi ve telefonu:

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

2016-2021: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği (Tıpta uzmanlık)

2007-2014: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi (Tıp eğitimi)

III- Ünvanlar

IV- Mesleki Deneyimi

(2016) Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Acil Servis – Pratisyen Hekim

(2016-2021) Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği- Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

- 7. Abant Anestezi Sempozyumu (Nisan 2019) : “Yoğun bakımda İnvazif Kandida Enfeksiyonu Tanılı Hastalarda Kalp ve Göz Bulgularını Değerlendirilmesi” sözlü bildiri
- Yakup T., Palabıyık O., Oztatar M., Karabay O. (2019) The Prevalence of Cardiac and Ocular Findings in Patients with Invasive Candida Infection in Intensive Care Unit. Turkish Journal of Medical & Surgical Intensive Care Medicine. Dec2019, Vol. 10 Issue 3, p85-89. 5p.
- Cerrahi Sonrası Kronikleşen Ağrı (2020), "Çocuklarda Postoperatif Kronikleşen Ağrı" kitap bölümü

VII- Bilimsel Etkinlikleri

VIII- Diğer Bilgiler

Katıldığı kongre ve seminerler

- Kanamalı Cerrahilerde Perioperatif Hematolojik Sorunlar ve Çözümler, TARD Farkındalık Toplantısı (Aralık 2017)
- 7. Abant Anestezi Sempozyumu, Bolu (Nisan 2019)
- Ortopedik Cerrahi Anestezisinde İleri Düzey Periferik Sinir Blokları Kursu, Rejyonel Anestezi Derneği, İstanbul (Eylül 2019)
- Sakarya Sağlık Müdürlüğü Yenidoğan Canlandırma Programı (NRP) Sertifikasyon Kursu, Sakarya (Ekim 2019)
- Sakarya Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Kursu (Kasım 2019)

- Interdisciplinary Seminar on Perioperative Bleeding and Patient Blood Management in Cardiac Surgery, EurAsia Heart Foundation (Switzerland), Ankara (Aralık, 2019)
- Resüsitasyon Derneği İleri Yaşam Desteği (ERC) Uygulayıcı Sertifikasyon Kursu, Eskişehir (Aralık, 2019)
- 54. Ulusal Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon E-Kongresi (Ekim 2020)
- 20. Ulusal Yoğun Bakım E-Kongresi, İstanbul (Kasım 2020)
- Temel ve İleri yaşam desteği E-Sempozyum, Resüsitasyon Derneği (Nisan 2021)
- 9. TARD Asistan Okulu (Mayıs 2021)
- 8. Abant Anestezi E-Sempozyumu (Mayıs 2021)
- Obstetrik Anesteziye Güncel Bakış E-Sempozyum, TARD (Haziran, 2021)
- 55. Ulusal Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, Antalya (Ekim 2021)
- İleri Klinik Ultrasonografi Kursu, TARD, Antalya (Ekim 2021)
- 5. Palandöken Anestezi E-Sempozyumu (Kasım 2021)