

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

**DENEYSEL BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE ÖĞRENME VE HAFIZA
DEĞİŞİKLİKLERİNE GHRELİNİN ETKİSİ VE
MEKANİZMALARI**

Göksun BAŞARANLAR ÖNCEL

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

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

**DENEYSEL BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON
MODELİNDE ÖĞRENME VE HAFIZA
DEĞİŞİKLİKLERİNE GHRELİNİN ETKİSİ VE
MEKANİZMALARI**

Göksun BAŞARANLAR ÖNCEL

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Narin DERİN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2009.02.0122.017)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2011

ÖZET

Serebral iskemi dünya genelinde üçüncü ölüm ve birinci morbidite sebebidir. Serebral iskemi/reperfüzyona (İ/R) her yıl yüz binlerce insan maruz kalmakta ve bu hastaların %45'i özel tıbbi destek almadan iyileşememektedir. Serebral İ/R, ağır öğrenme ve hafıza bozukluğuna sebep olduğu için çalışmamızda hipokampal hasar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Antioksidan ve hafıza geliştirici özellikleri sebebiyle açlık hormonu olarak adlandırılan ghrelin tedavi edici ajan olarak seçilmiştir.

Çalışmamızda 80 adet 3 aylık Wistar erkek sıçan, her grupta 20 hayvan olacak şekilde rastgele bölünerek sham (SHAM), ghrelin (GHR), iskemi/reperfüzyon (İ/R) ve iskemi/reperfüzyon+ghrelin (İ/R+GHR) grupları oluşturulmuştur. Deney süresi boyunca SHAM grubuna ameliyat sonrasında 3 gün boyunca serum fizyolojik, GHR grubuna ameliyat yapıp 3 gün boyunca ghrelin, İ/R grubuna İ/R uygulanıp 3 gün boyunca serum fizyolojik ve İ/R+GHR grubuna İ/R uygulanıp 3 gün boyunca ghrelin intraperitoneal olarak verilmiştir. Ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlerde Y labirent ve açık alan testleri uygulanmış, 72. saatte ise sıçanlardan kan örnekleri alınıp beyin dokuları çıkartılmıştır. İskemi/reperfüzyon hasarını göstermek amacıyla hematoksilen eozin boyaması yapılmış, plazmada açile ghrelin ve deaçile ghrelin düzeyleri ile hipokampusta total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), nitrit+nitrat, iNOS ve nNOS seviyelerine, bakılmıştır.

İ/R grubunun davranış testleri sonucunda öğrenme ve hafızada bozulma olduğu ve buna paralel olarak İ/R grubunun hipokampal TOK değerlerinin SHAM gruba göre arttığı görülmüştür. İ/R+GHR grubunun TOK değerleri ile SHAM ve GHR grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamış, öğrenme ve hafıza bozulmasının İ/R grubuna göre belirgin biçimde düzeldiği tespit edilmiştir. Grupların TAK değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Plazma ghrelin düzeyleri incelendiğinde GHR grubu plazma açile ghrelin düzeyinin SHAM gruba göre arttığı, İ/R+GHR grubu değerlerinin ise GHR ve İ/R grubuna göre azaldığı görülmüştür. SHAM, GHR ve İ/R gruplarının plazma deaçile ghrelin seviyeleri arasında fark bulunmazken, İ/R+GHR grubunun değerlerinin SHAM ve İ/R grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Hematoksilen eozin boyaması sonucunda İ/R grubunda hipokampal nöron hasarı olduğu, İ/R+GHR grubunda hasarın azaldığı gözlenmiştir. GHR, İ/R ve İ/R+GHR gruplarının hipokampal nitrit+nitrat seviyeleri arasında fark görülmezken, tüm grupların değerleri SHAM gruba göre artmıştır. İ/R grubunda hipokampustaki iNOS ekspresyonu diğer gruplara göre belirgin biçimde artmıştır. Hipokampal nNOS ekspresyonunun GHR, İ/R ve İ/R+GHR gruplarında SHAM gruba göre arttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, global serebral İ/R'nin total oksidan kapasiteyi arttırmakla beraber öğrenme ve hafıza bozukluğuna yol açtığı, ghrelinin serebral İ/R hasarını tedavisinde fayda sağlayabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: İskemi/Reperfüzyon, Öğrenme ve Hafıza, Nitrik Oksit, Ghrelin

ABSTRACT

Cerebral ischemia is the third leading cause of death and first cause of morbidity worldwide. Hundreds of thousands of people suffer from cerebral ischemia reperfusion injury each year and approximately 45% of those patients cannot heal without private medical aid. Since the most striking result of cerebral ischemia reperfusion injury is learning and memory impairment, we focused on mechanisms relating cerebral ischemia reperfusion injury to hippocampal damage. Ghrelin, so-called hunger hormone, is used as a therapeutic agent in our study because of its antioxidant and memory enhancing effects.

Eighty adult male Wistar rats were divided randomly into Sham (SHAM), Ghrelin (GHR), Ischemia/Reperfusion (I/R) and Ischemia/Reperfusion+Ghrelin (I/R+GHR) groups. SHAM group rats only underwent sham surgery, i.e. without any vessel occlusion, and received saline daily for three reperfusion days. GHR group rats also underwent sham surgery, additionally, they were administered ghrelin daily for three days of reperfusion. I/R group rats were exposed to global cerebral ischemia/reperfusion and given saline daily for three days of reperfusion. I/R+GHR group rats, however, both underwent global cerebral ischemia/reperfusion surgery and received ghrelin daily for three days of reperfusion. Y-Maze and Open Field tests were carried out at postischemic 24th and 48th hours. On the third reperfusion day, blood samples and brains of the animals were collected. Plasma acylated ghrelin levels, plasma unacylated ghrelin levels, total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS), nitrate + nitrite levels, iNOS and nNOS expressions in the hippocampi were analysed.

Y-maze and Open Field test results revealed that cerebral ischemia/reperfusion caused learning and memory impairment due to hippocampal damage. Furthermore, ghrelin administration attenuated ischemia/reperfusion induced cognitive impairment. High TOS levels of I/R group were in consistency with hippocampal damage. Plasma acylated ghrelin levels were increased in GHR group with respect to SHAM group and, I/R+GHR group acylated ghrelin levels were significantly decreased with respect to GHR and I/R groups. Unacylated ghrelin plasma levels were dramatically decreased in I/R+GHR group in reference to SHAM and I/R groups. Hippocampal nitrate+nitrite levels of GHR, I/R and I/R+GHR groups were sharply increased with respect to SHAM group. iNOS expression in the hippocampi of I/R group was markedly increased in reference to other groups. nNOS levels of GHR, I/R and I/R+GHR groups were slightly increased in reference to SHAM group.

In conclusion, our study clearly showed that cerebral ischemia/reperfusion resulted in TOS increase coupled with cognitive impairment and ghrelin can be proposed as a therapeutic agent for cerebral ischemia/reperfusion injury.

Key words: Ischemia/Reperfusion, Learning and Memory, Nitric Oxide, Ghrelin

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerekleştirilmesinde değerli katkılarıyla bana yol gösteren değerli hocam Doç.Dr.Narin DERİN'e, öneri ve eleştirileri için Prof.Dr.Piraye YARGIOğLU'na, cerrahi girişimlerdeki büyük katkılarından dolayı Erol NİZAMOğLU'na, teknik olanakları ile deneysel çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Deney Hayvanları nitesi ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Nermin BAŞARANLAR'a ve babam Coşkun BAŞARANLAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. İskemi reperfüzyon	4
2.1.1 iskemi reperfüzyon hasarı	4
2.1.2. İskemi reperfüzyon hasar mekanizmaları	6
2.1.3. Serebral iskemi reperfüzyonda oksidatif ve nitrozatif stres	7
2.1.4. Serebral iskemi reperfüzyonda antioksidan savunma	11
2.1.5. Serebral iskemi reperfüzyon ve hücre ölümü	12
2.1.6. Serebral iskemi reperfüzyonun öğrenme ve hafıza üzerine etkileri	14
2.2. Öğrenme ve hafıza	14
2.2.1. Hipokampusun yapısı	17
2.2.2. Uzun süreli güçlenme (ltp)	18
2.2.3. Ltp'nin moleküler mekanizmaları	19
2.2.4. Ltd – uzun süreli azalma	20
2.2.5. Deneysel öğrenme modelleri	22
2.3. Ghrelin	23
2.3.1. Ghrelin reseptörleri	24
2.3.2. Ghrelinin lokalizasyonu	24
2.3.3. Ghrelinin fizyolojik etkileri	25
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	28
3.1. Gruplandırma ve deney protokolü	28
3.2. öğrenme parametrelerin tayini	29
3.2.1.y-labirent testi	29

3.2.2. Açık alan testi	30
3.3. Biyokimyasal parametrelerin tayini	30
3.3.1. Plazma açile ghrelin tayini	30
3.3.2. Plazma deaçile ghrelin tayini	30
3.3.3. Total antioksidan kapasite tayini (tak)	31
3.3.4. Total oksidan kapasite tayini (tok)	31
3.3.5. Nitrit/nitrat tayini	31
3.3.6. Protein tayini	32
3.4. N-nos ve inos düzeylerinin immunohistokimyasal tayini	32
3.6. Sonuçların değerlendirilmesi	33
BULGULAR	34
4.1. Genel görünüm	34
4.2. Y- labirent testi sonuçları	34
4.3. Açık alan testi sonuçları	38
4.4. Plazma açile ve deaçile ghrelin sonuçları	40
4.5. Total antioksidan kapasite sonuçları	41
4.6. Total oksidan kapasite sonuçları	42
4.7. Nitrit/nitrat sonuçları	43
4.8. İmmünohistokimya sonuçları	44
4.8.1. iNOS sonuçları	44
4.8.2. nNOS sonuçları	45
4.9. Hematoksilen eozin boyama sonuçları	46
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SOD	: Süperoksit dismutaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
CS	: Koşullu uyarıcı
LTP	: Uzun süreli potansiyasyon
SHAM	: Sham grubu
GSH	: Glutasyon
NO	: Nitrik oksit
PUFA:	: Poliansatüre yağ asitleri
KA	: Kainik asit
NMDA	: N-metil D- aspartat
AMPA	: A-amino-3 hidroksi 5-metil- 4 isoksazol propionik asit
Ca⁺²	: Kalsiyum
Na⁺	: Sodyum
K⁺	: Potasyum
CaMKII	: Kalsiyum kalmodulin kinaz II
IP3	: 1, 4, 5, inozitol trifosfat
PLC	: Fosfolipaz C
DAG	: Diaçilgliserol
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
GHR	: Ghrelin grubu
İ/R	: İskemi reperfüzyon grubu
CA	: Cornu ammonis
LTD	: Uzun süreli azalma
Mg⁺²	: Magnezyum
TAK	: Total antioksidan kapasite
TOK	: Total oksidan kapasite
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
EPSP	: Eksitator postsinaptik potansiyel
AC	: Adenilil siklaz
RNA	: Ribonükleik asit
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
4-VO	: Dört damar oklüzyonu
EEG	: Elektroensefalografi
GH	: Büyüme hormonu
GHS	: Büyüme hormonu sekretegogu
GHSR	: Büyüme hormonu sekretegog reseptörü
GHRH	: Büyüme hormonu salıcı hormon

NPY	: Nöropeptid Y
AgRP	: Agoui related peptid
PHMB	: P-hidroksimerküribenzoik asit
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
CRH	: Kortikotrofin salıcı hormon
HCl	: Hidroklorik asit
DAB	: Diamino benzidin
PKC	: Protein kinaz C
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ONOOH	: Peroksinitröz asit
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
cNOS	: Konstitütif nitrik oksit sentaz
MCA	: Orta serebral arter
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OH⁻	: Hidroksil radikali
XO	: Ksantin oksidaz
COX	: Siklooksijenaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ONOO⁻	: Perksinitrit
3-NT	: 3-nitrotirozin
L-NAME	: L-NG-nitroarjinin metil ester
L-NA	: NG-nitro-L-arjinin
NO₃⁻	: Nitrat
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
Mn-SOD	: Mangan süperoksit dismutaz
CuZn-SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
EC-SOD	: Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
LOO	: Peroksil radikali
LTM	: Uzun süreli hafıza
STM	: Kısa süreli hafıza
Fe³⁺	: Ferrik demir
Fe²⁺	: Ferröz demir
O₂	: Moleküler oksijen
NO⁺	: Nitrozonyum katyonu
NO⁻	: Nitrozil anyonu
4Fe-4S	: Demir sülfür
US	: Koşulsuz uyarıcı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2.1. Willis Poligonu	6
2.2. Genel iskemi reperfüzyon hasar mekanizması	8
2.3. NO üretimi	9
2.4. Serebral iskemi reperfüzyon hasar mekanizması	11
2.5. İskemi genel hasar mekanizması	13
2.6. Uzun ve kısa süreli hafıza türleri	16
2.7. Hipokampal yollar	17
2.8. Normal sinaptik ileti ve LTP	21
2.9. Ghrelin'in Moleküler Yapısı	24
2.10. Ghrelinin reseptörü üzerinden etki mekanizması	25
2.11. Ghrelinin oreksijenik etki mekanizması	26
3.1 Y labirenti	29
4.1. Novel Kola Giriş Frekansları	35
4.2. Novel Kolda Geçirilen Zaman	36
4.3. Y-labirent testinde alınan toplam yol	37
4.4. Açık Alan Testinde Girilen Kare Sayısı	38
4.5. Açık Alan Testinde Alınan Toplam Yol	39
4.6. Plazma Açile/Deaçile Ghrelin Değerleri	40
4.7. Hipokampus TAK sonuçları	41
4.8. Hipokampus TOK değerleri	42
4.9. Hipokampus Nitrit+Nitrat Değerleri	43
4.10 Hipokampusta SHAM grup iNOS ekspresyonu	44
4.11. Hipokampusta GHR grubu iNOS ekspresyonu	44
4.12. Hipokampusta İ/R grubu iNOS ekspresyonu	44
4.13. Hipokampusta İ/R+GHR grubu iNOS ekspresyonu	44
4.14. Hipokampusta SHAM grup nNOS ekspresyonu	45
4.15. Hipokampusta GHR grubu nNOS ekspresyonu	45
4.16. Hipokampusta İ/R grubu nNOS ekspresyonu	45
4.17. Hipokampusta İ/R+GHR grubu nNOS ekspresyonu	45
4.18. Hipokampusta H&E boyama 20X	46
4.19. Hipokampusta H&E boyama 40X	46
4.20. CA1 Bölgesinde yaşayan nöron sayısı	46

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
2.1. Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları	7
4.1. Grupların yeni kola giriş frekansları.	35
4.2. Grupların yeni kolda geçirdiği süre.	36
4.3. Grupların Y-labirent testinde aldıkları toplam yol.	37
4.4. Açık alan testinde girilen kare sayısı.	38
4.5. Açık alan testinde alınan toplam yol.	39
4.6. Plazma açile ve deaçile ghrelin değerleri.	40
4.7. Hipokampusta total antioksidan kapasite değerleri.	41
4.8. Hipokampusta total oksidan kapasite değerleri.	42
4.9. Hipokampusta Nitrit + Nitrat değerleri.	43
4.10. Hipokampusta CA1 Piramidal Tabaka Kalınlığı	46

GİRİŞ

Serebral iskemi, serebral kan akışının beynin tamamında veya belirli bir bölgesinde hasar oluşturabilecek biçimde kritik bir eşik değerin altına düşmesi olarak tanımlanmaktadır. Beyin dokusunda normal serebral kan akışı dakikada 50-75 mL/100g iken, 18 mL/100g seviyesine düştüğünde iskemi, 10 mL/100g'ın altına düştüğünde ise nöronal hücre ölümü görülmektedir [1].

Serebral kan akışının yeniden sağlandığı reperfüzyon sürecinde, nötrofil göçü, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artması, serebral ödem ve aşırı kan kaybı gibi nedenlerle beyin hasarı ortaya çıkmaktadır. Reaktif oksijen türleri ve RNS'deki artış, oksidasyon ve hücre ölümünü tetikleyen diğer yollarla intrasellüler proteinlerde ve deoksiribonükleik asitte (DNA) hasara yol açmaktadır [1]. Her ne kadar ROS ve RNS normal metabolik süreçlerde oluşsalar ve önemli fizyolojik mekanizmalarda yer alsalar da, oksidatif strese bağlı olarak fazla miktarda üretildiklerinde hücreye zarar vermektedirler [2]. İskemi-reperfüzyon hasar mekanizmalarını çalışmak için pek çok deneysel hayvan modeli kullanılmaktadır. Kemirgenlerde uygulanan en temel iki in vivo model; global iskemi ve fokal iskemidir [3]. Global iskemi, serebral kan akışının beynin tamamında, fokal iskemi ise serebral kan akışının beynin belirli bir bölgesinde azalmasıdır. Sıçanlarda global iskemi oluşturmak için dört damar oklüzyon modeli veya iki damar oklüzyon modeli kullanılmaktadır. Bu hayvan modellerinde, hipokampus CA1 piramidal nöronlarının, striatumdaki nöronların, serebellum purkinje hücrelerinin iskemik hasara duyarlı olduğu ve bu nöronlarda ölümlerin meydana geldiği gösterilmiştir [1].

İskemik nöron ölümleri genelde iskemiden günler sonra gerçekleşir ve buna ertelenmiş nöron ölümü denir. Nöron ölümündeki bu gecikme beynin etkilendiği bölgeye ve iskeminin uygulanma süresine göre değişkenlik göstermektedir. Bazı durumlarda ertelenmiş nöron ölümü günler ya da haftalar alırken bazılarında ise bir kaç saat veya daha kısa zamanda oluşur [4, 5]. Her nöron popülasyonunun iskemiye karşı duyarlılığı farklıdır [6]. Örneğin; 5 dakikalık global iskemi CA1 bölgesindeki piramidal nöronların hemen hemen tamamında ertelenmiş nöron ölümüne yol açıp diğer nöronları etkilemezken, 20 dakikalık iskemi CA3 bölgesindeki nöronlarda ölüme neden olmuş, fakat hipokampustaki dentat granül hücrelerine ve CA1 bölgesindeki ara nöronlara etki etmemiştir [7, 8]. Daha önce belirtildiği gibi hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar, serebral iskemiye karşı en duyarlı olan nöronlardandır. Bilindiği üzere hipokampus, karmaşık (dekleratif) hafızanın depolandığı ve hafızanın pekiştirildiği kortikal beyin bölgesidir [9]. İskemi sonrasında CA1 piramidal nöronlarının ölümü uzaysal (spatial) öğrenme ve hafıza gibi hipokampus bağımlı beyin fonksiyonlarında ciddi kayıplara yol açmaktadır [10]. Uzaysal hafıza yer, yön ve uzaysal ipuçlarının öğrenilmesi ve daha sonra hatırlanmasını gerektiren bir süreçtir [11]. Kemirgenlerde uzaysal hafızanın değerlendirilmesinde T-labirent ve Y-labirent testleri kullanılmaktadır [12]. Geçici global serebral iskemi uygulanan sıçanlarda Y-maze testi ile hafızada bozulma

olduğu ve hipokampus CA1 bölgesinde lipid peroksidasyonun arttığı tespit edilmiştir [13].

Hipokampustaki nöronal yolların yüksek frekanslı (100Hz) uyarılması sinaptik etkinlikte uzun süreli artışa neden olmakta ve bu elektrofizyolojik olaya uzun süreli güçlenme (LTP) denmektedir. Hafızanın temeli olarak bilinen LTP, aktivite bağımlı sinaptik plastisitenin bir formudur [14]. Beyinde bir çok yolda LTP oluşur ve LTP oluşumunda primer mekanizma N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonudur. N-metil-D-aspartat reseptörlerinin aktivasyonu için presinaptik membrandan salınan glutamatın reseptöre bağlanması ve AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit) reseptör aktivasyonu aracılığıyla yeterli postsinaptik depolarizasyonun oluşması gerekmektedir [15]. N-metil-D-aspartat reseptörlerinin aktivasyonu ile oluşan hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış LTP'yi başlatan olaydır. Kalsiyum girişi G-protein aracılı metabotrofik glutamat reseptörlerinin aktivasyonunu da artırır ve IP3 (inozitol-trifosfat) sistemi yoluyla hücre içi depolardan kalsiyum salınmasına neden olur [14]. Postsinaptik nöronda kalsiyum seviyesinin yükselmesi protein kinaz C (PKC) ve kalsiyum/kalmodulin kinaz II (CaMKII) enzimlerinin aktivasyonuna neden olur. Kalsiyum/kalmodulin kinaz II nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerini aktive ederek nitrik oksit (NO) oluşmasını sağlar. Nitrik oksit postsinaptik nörondan difüzyon yolu ile presinaptik nörona geçerek daha fazla glutamatın sinaptik aralığa salınmasına neden olur [16].

Nitrik oksit, L-Arjinin ve oksijenden (O₂) NOS enziminin kataliziyle üretilir ve yan ürün olarak da sitrulin ortaya çıkar. Nitrik oksit organizmada farklı hücre tiplerinde üç ayrı NOS ile oluşturulur. Bu izoformlar nöronal NOS (nNOS-TipI), endotelial NOS (eNOS-TipII) ve indüklenebilir NOS (iNOS-TipIII) olarak bilinir [17]. Nöronal NOS merkez ve periferik sinir sistemi hücrelerinde görülür, aktivasyonu CaMKII bağımlıdır. Nöronal nitrik oksit sentazın merkezi sinir sisteminde dağılımı homojen değildir; serebellum, serebral korteks, hipotalamus, hipokampus ve amigdalada daha fazla miktarda bulunur. Endotelial NOS damar endotel hücrelerinde bulunur ve nNOS gibi CaMKII bağımlı aktiviteye sahiptir. Nöronal NOS ve eNOS konstitütif NOS (cNOS) olarak da adlandırılırlar. İndüklenebilir NOS ise makrofaj hücrelerinde bulunur ve cNOS'tan farklı olarak aktivitesi CaMKII bağımlı değildir [18].

Deneyisel serebral iskemik çalışmaları sonucunda, hasar sonrası ekspresyon modellerinin farklı olmasına rağmen, bütün NOS izoformlarında artış (up-regülasyon) gözlenmiştir [19-21]. Sıçanlarda geçici iskemik uygulaması korteksteki nNOS immünoaktif nöronlarda ilk 15 dakikada belirgin bir artışa ve takip eden 24 saat boyunca da ekspresyonun devamına sebep olmuştur [19]. Kalıcı iskemide ise iskemik çekirdeğin serebral damarlarında eNOS ekspresyonu 24 saatte maksimal değere ulaşmıştır [20]. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu da yerleşik ve göçen hücrelerde iskemiyeye cevap olarak indüklenebilir [20, 21]. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz indüksiyonunun eNOS ve nNOS ekspresyonundan daha sonra oluşması iNOS'un erken hasara katkısının olmadığını göstermektedir. Deneyisel serebral iskemik modellerinde NO donörleri ve NOS inhibitörleri uygulanarak çeşitli

çalışmalar yapılmış ve bir takım sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, fokal iskemiyi takiben uygulanan NO prekürsörünün damarlarda dilatasyon yaparak serebral kan akışını şiddetlendirdiği ve infarkt hacminde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir [22, 23]. El Eter ve arkadaşlarının [24] yaptığı gastrik iskemi çalışmasında ise iNOS ekspresyonunu azaltan bir ajan olarak ghrelin kullanılmış ve İ/R'ye bağlı gastrik hasarın hafiflediği tespit edilmiştir.

Ghrelin ; 28 amino asitten oluşan açillenmiş bir peptid hormondur ve büyüme hormonu sekretagog reseptörünün (GHSR) endojen ligandı olarak ilk defa 1999'da tanımlanmıştır [25]. Ghrelinin büyük bir kısmı midede üretilirken, geri kalan kısmı da ince barsak, pankreas, hipofiz bezi, böbrek ve plasentada üretilmektedir [26]. Yapılan çalışmalarda sıçanların midelerinin asit üreten kısmını aldıktan sonra dolaşımında bulunan ghrelin miktarının %80 azaldığı belirlenmiştir [27]. İskemi reperfüzyon hasarında ghrelinin iNOS ekspresyonunu azaltmasının yanı sıra antioksidan aktivitesinin de olduğu düşünülmektedir. El Eter ve arkadaşları [24] periferel ghrelin uygulamasının gastrik iskemide ROS üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ghrelinin ROS üretimini nasıl inhibe ettiğine dair mekanizmalar henüz aydınlatılmamış olup ROS üretiminde görev alan bazı enzimleri bloke ederek bu etkiyi gerçekleştirdiği düşünülmektedir . Ayrıca barsak İ/R'si oluşturulan bir çalışmada plazma ghrelin düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir [28]. Global beyin İ/R'sinde plazma ghrelin düzeylerinde değişim olup olmadığı ise bilinmemektedir.

İskemi reperfüzyonun öğrenme üzerine olan etkileri göz önünde bulundurularak, iskemiyeye bağlı öğrenme ve hafıza değişikliklerinde ghrelinin etkisinin olup olmadığına dair bir çalışma yapılmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada İ/R hasarına bağlı hipokampal apoptozisin ghrelin tedavisi ile düzeldiği gösterilmiş, ancak literatürde mekanizma ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır [29, 30]. Bu bilgilerin ışığı altında, projemizde aşağıdaki amaçların gerçekleştirilmesi planlanmıştır:

1. Global beyin İ/R hasarına bağlı uzaysal hafıza değişiklikleri ve ghrelinin etkileri öğrenme deneyleri ile değerlendirilecek,
2. Global beyin İ/R'si oluşturulan sıçanlarda plazma ghrelin düzeylerine bakılacak ve ghrelin düzeyi ile öğrenme deneyleri arasındaki ilişki değerlendirilecek,
3. Ghrelinin hipokampustaki olası etkilerinde iNOS ve nNOS'un rolünün olup olmadığı saptanacak,
4. Beyin İ/R'sinde oksidan ve antioksidan kapasite değişikliklerinde ghrelinin etkisi ve öğrenme parametreleri ile ilişkisi ortaya konacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi Reperfüzyon

2.1.1 İskemi Reperfüzyon Hasarı

Bir organ ya da dokuya gelen kan akımının kesilmesine iskemi, etkilenen alanın tekrar kanlanmasına reperfüzyon denmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı inme, miyokardiyal enfarktüs, şok, organ cerrahisi ve organ transplantasyonu sonrasında önemli problem oluşturmaktadır [31].

Serebral iskemi, serebral kan akışının beynin tamamında veya belirli bir bölgesinde hasar oluşturabilecek biçimde kritik eşik değerin altına düşmesi olarak tanımlanmaktadır. Beyin dokusunda normal serebral kan akışı dakikada 50 – 75 mL/100g iken, 18 mL/100g seviyesine düştüğünde iskemi, 10 mL/100g'ın altına düştüğünde ise nöronal hücre ölümü görülmektedir [1]. Serebral iskemi dünya genelinde üçüncü mortalite sebebidir ve akut fazda mortalite oranı %20 düzeyindedir. Serebral iskemik atağa maruz kalan kişilerin %40'ı yaşamlarını sürdürmek için kişisel bakım desteği almakta, %25'i ise yardımsız yürüyememektedir [32].

Serebral iskemi temel olarak iki şekilde incelenmektedir. Bunlar; global serebral iskemi ve fokal serebral iskemidir. Global serebral iskemi beynin tamamında kan akışının azalması iken, fokal iskemi kan akışının beynin belli bir bölümünde azalması olarak tanımlanmaktadır. Klinik olarak global iskemide ventriküler fibrilasyon veya 5 – 10 dakika süren kardiyak arrest, fokal iskemide ise tromboembolik veya atherotrombotik vazo-oklüsiv hastalıklar sebep olmaktadır. Fokal serebral iskemide global iskemiden farklı olarak iskemik çekirdek ve iskemik penumbra bölgeleri oluşmaktadır. İskemik çekirdek serebral kan akışının ciddi derecede azaldığı (iskemik) odak bölgedir. İskemik penumbra ise iskemik çekirdeğin daha distalinde bulunan ve kollateral damarlar ile az da olsa beslenmeye devam eden beyin dokusudur. İskemik çekirdekte majör olarak nekrotik nöronlar bulunurken, penumbra apoptotik nöronların daha fazla olduğu belirlenmiştir [1].

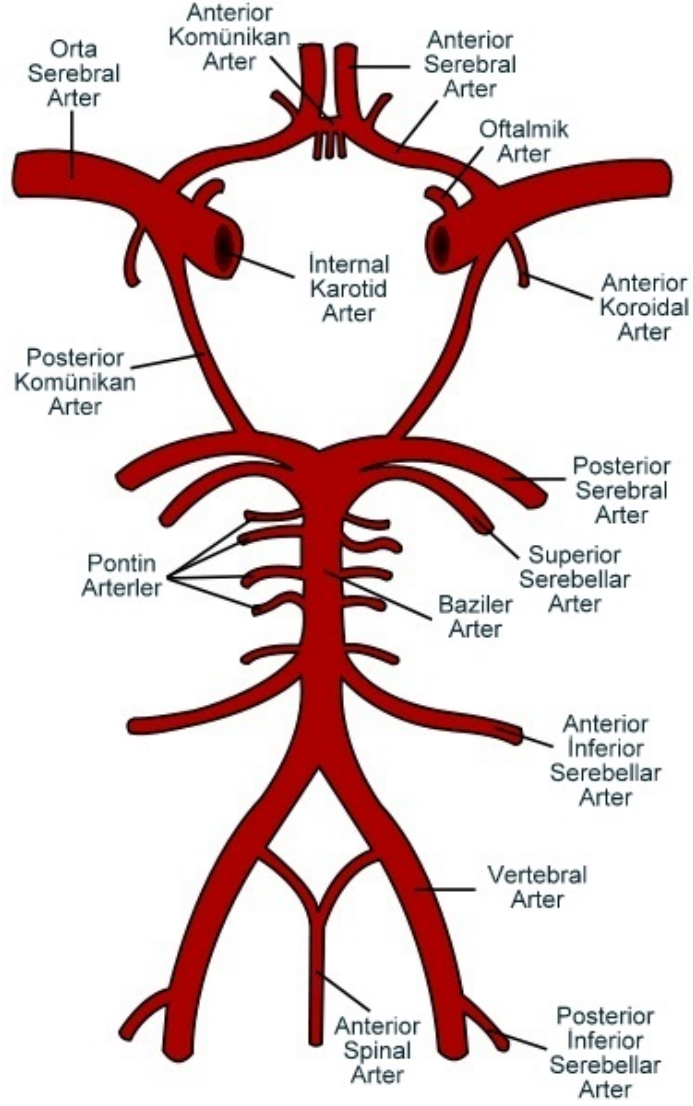
İnsanlarda oluşan global serebral iskemi hasar mekanizmalarını aydınlatılmak amacıyla hayvanlarda pek çok deneysel iskemi modeli oluşturulmuştur. Bu modellerde en çok kemirgenler kullanılmaktadır. Kemirgen (gerbil, fare ve sıçan) kullanılmasının sebeplerinden bazıları, maliyetin düşük olması, serebral hasarın tutarlı bir biçimde tekrarlanabilmesi, transgenik türlerin elde edilmesi ve iskemik beyin hasarının spesifik mekanizmalarının çalışılabilmesidir. Temel olarak iki deneysel serebral iskemi modeli bulunmaktadır. Bunlar fokal serebral iskemi ve global serebral iskemi modelleridir [1],[3].

Fokal Serebral İskemi Modelleri

Pek çok memeli türünde fokal serebral iskeminin hemen hemen tüm modelleri orta serebral arterlerden (middle cerebral artery – MCA) birinin oklüzyonunu içermektedir (Şekil 2.1) [33]. Fokal serebral iskemi modelinin global serebral iskemi modellerinden ayrıldığı iki farklı özellik mevcuttur. Birincisi, fokal iskeminin çekirdek bölgesinde bile kan akışı global iskekiye nazaran oldukça fazladır. Dolayısıyla, fokal iskemi modellerinde serebral hasar oluşturabilmek için gereken iskemi süresi global iskemi modellerinden daha uzundur. İkincisi, fokal iskemide lezyon farklı metabolik koşullar sebebiyle çekirdekten penumbranın distal sınırına kadar belirgin farklılıklar göstermektedir. Sonuç olarak, uygulama süresi ve lezyon heterojenliği açısından fokal iskemi global iskemi modelinden çok daha kompleks bir uygulamadır [3]. Günümüzde en sık uygulanan fokal serebral iskemi modelinde MCA'nın proksimalinden oklüzyon yapılmaktadır. Nylon bir suture karotid arter içine yerleştirildikten sonra MCA dallanma noktasına kadar yürütülerek MCA'nın başlangıç noktasından oklüzyon sağlanmaktadır [3, 34, 35].

Global serebral iskemi modelleri

Kemirgenlerde global serebral iskemi dört damar oklüzyonu veya iki damar oklüzyonu teknikleriyle oluşturulmaktadır. Dört damar oklüzyonu tekniğinde vertebral arterlerin elektrokoagülasyonundan hemen sonra veya 24 saat sonra arteria carotis communis geçici olarak oklüde edilmektedir (Şekil 2.1). İki damar oklüzyonu ise arteria carotis communisin geçici oklüzyonunun yanı sıra arterial kan basıncının 40 – 50 mmHg düzeyine düşürülmesiyle gerçekleştirilmektedir. Gerbillerde global serebral iskemi oluşturulurken posterior kommunikan arterler gelişmediği için, sadece arteria carotis communis oklüde edilmektedir. Her iki modelde de önbeyin yapılarında ileri derecede iskemi oluşturulmaktadır [1],[3].



Şekil 2.1. Willis Poligonu

2.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları

İskemide nöronal fonksiyonu etkileyen en temel faktör adenosin trifosfat (ATP) azalmasıdır. İskemi sürecinde oksijen ve glukozun azalması nedeniyle ATP üretilmemekte, ATP yoksunluğu ATP-bağımlı iyon pompalarını inaktive ederek membran depolarizasyonuna neden olmakta ve transmembran iyon gradientleri bozulmaktadır. İyon gradientinin bozulması Ca^{2+} 'nin ekstrasellüler ortamdan intrasellüler ortama geçmesine neden olmakta ve sellüler proteazlar ve lipazlar aktive olarak serebral doku hasarını başlatmaktadır [36].

İskemiyi takip eden reperfüzyon, serebral kan akışını düzeltirken, nötrofil göçü, ROS ve RNS'de artış, serebral ödem gibi yollarla beyin hasarına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri ve RNS'deki artış, oksidasyon ve hücre ölümünü tetikleyen diğer yolaklarla beraber intrasellüler proteinlerde ve DNA'da hasara yol açmaktadır [1]. Her ne kadar ROS ve RNS normal metabolik süreçlerde oluşup

önemli fizyolojik mekanizmalarda yer alsalar da, oksidatif strese bağlı olarak fazla miktarda üretildiklerinde hücreye zarar vermektedirler.

2.1.3. Serebral İskemi Reperfüzyonda Oksidatif ve Nitrozatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerin yüksek miktarda moleküler oksijene veya ROS'ye maruz kalması ile oluşan haraplayıcı etkinin antioksidanlarla dengelenemediği durumları ifade etmektedir. Oksidatif stres, yaşlanma, ateroskleroz, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve inme gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde yer almaktadır [37]. İnme (Stroke) patogenezinde oksidatif stresin oldukça güçlü bir etkiye sahip olması beyin ROS kaynaklı hasara fazlasıyla duyarlı olmasına bağlanmaktadır. Beynin bu duyarlılığı, peroksitide olabilen lipid konsantrasyonunun yüksek ve protektif antioksidanların düşük seviyede olması, fazla oksijen tüketimi, patolojik koşullarda prooksidan etki gösteren yüksek demir konsantrasyonu ve dopamin, glutamat oksidasyonunu içeren çok miktarda reaksiyonun oluşmasına bağlanmaktadır [37]. Reaktif oksijen türleri, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi makromolekülleri tahrip ederek hücresel hasara ve ölüme yol açmaktadır [38].

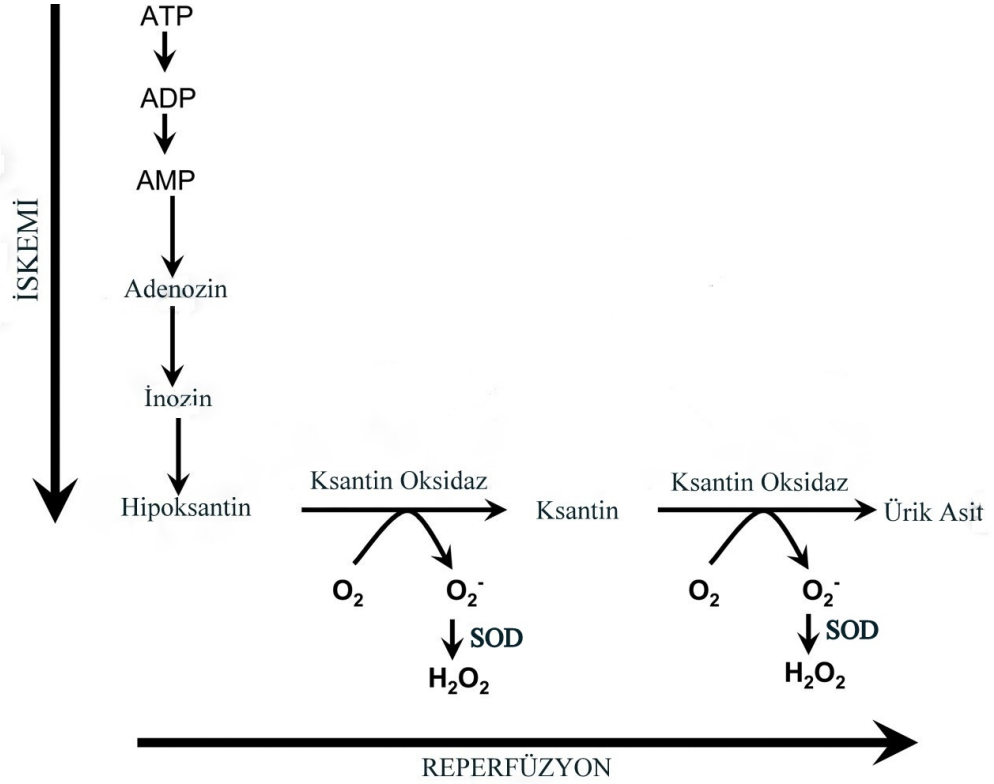
Reaktif oksijen türleri oksijen metabolizmasının doğal yan ürünleridir. Reaktif oksijen türleri, eşlenmemiş elektronlara sahip oldukları için kararlı duruma geçmeye çalışan reaktif yapılardır. Normal koşullar altında hücre sinyalizasyonu, mitojenik yanıt indüksiyonu, immün savunma, apoptozis ve toksik bileşiklerin kırılması gibi fizyolojik süreçlerde ROS pek çok yararlı fonksiyona sahipken, biyolojik stres ihtiva eden süreçlerde ROS toksik seviyeye gelecek miktarda birikerek hücresel hasara ve fonksiyon kaybına yol açmaktadır [39]. Üzerinde en çok durulan ROS süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir (OH^-) olup bu radikallerin simge ve elektron dağılımları Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları

Reaktif Oksijen Türleri	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2^- \cdot$	$\left[\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \right]^-$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$\cdot \ddot{O} : H$
Peroksit radikali	$O_2^{-2} \cdot$	$\left[\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot \right]^{-2}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$H : \ddot{O} :: \ddot{O} : H$
Singlet oksijen	1O_2	$\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot$

Süperoksit anyonu oksidan hasarda rol oynayan primer reaktif oksijen türüdür. Dokularda O_2^- oluşumuyla sonuçlanan pek çok reaksiyon bulunmaktadır. Süperoksit anyonunun hücresel kaynaklarından bazıları hemoglobin, miyogloblin gibi küçük moleküllerin oto-oksidasyonu, ksantin oksidaz (XO), NADPH oksidaz,

siklooksijenaz (COX) gibi oksidatif enzimler, mitokondriyal komponentler ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur [40]. Süperoksitin oluşma hızı, oksitlenebilir substrat konsantrasyonu, oksijen miktarı ve antioksidan enzimlerin aktivitesine bağlıdır. İskemide primer O_2^- kaynağı adenin nükleotidlerinin yıkımıyla oluşan hipoksantindir. Ksantin oksidaz enziminin oksijen varlığında hipoksantini kullanarak ksantin ve ürik asit oluşturması esnasında bol miktarda O_2^- açığa çıkmaktadır [3] (Şekil 2.2).

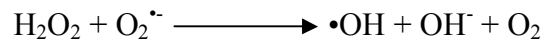


Şekil 2.2. Genel iskemi reperfüzyon hasar mekanizması

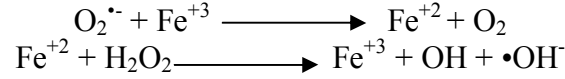
Süperoksit anyonunun süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle dismutasyonu veya oksijenin direkt indirgenmesiyle H_2O_2 oluşmaktadır (Şekil 2.2).



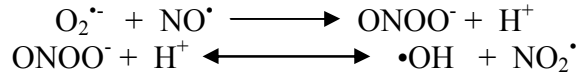
Hidrojen peroksit, O_2^- ile reaksiyona girerek OH^- oluşturmakta ve bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir.



Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat, geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Fenton reaksiyonları ile de Fe^{2+} varlığında H_2O_2 'den en reaktif ROS'lardan biri olan OH^- radikali üretilmektedir.

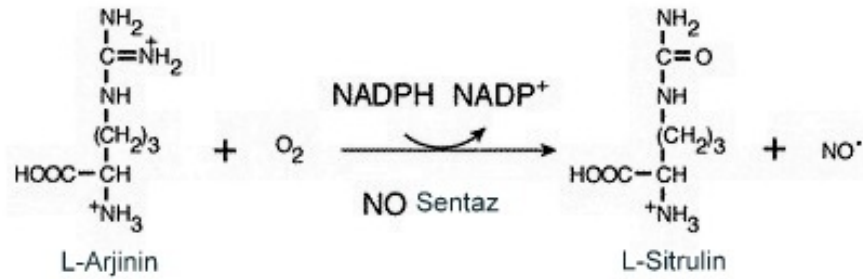


Oksijen radikallerinin NO ile reaksiyonu sonucu ise RNS üretilmektedir. Örneğin, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin NO^{\cdot} ile etkileşimi peroksinitröz asit (ONOOH) oluşturmakta ve ONOOH kendiliğinden OH^{\cdot} oluşturacak biçimde dekompoze olmaktadır [41]. İskemi reperfüzyon hasarında ROS'un yanı sıra RNS'nin de nitrozatif stres oluşturarak önemli rol aldığı bilinmektedir.



Nitrozatif stres, protein yapı ve fonksiyonlarını nitrozilasyonla değiştiren RNS üretiminin artmış olduğu durumdur. Reaktif nitrojen türleri, aynı ROS gibi normal koşullar altında üretilen fakat patolojik durumlarda üretiminde artış görülen yapılardır. İnflamatuvar süreçlerde immün hücreler $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve NO üretirler. Ortamda artan $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve NO^{\cdot} etkileşimiyle peroksinitrit (ONOO^-), nitrozonyum katyonu (NO^+) ve nitrozil anyonu (NO^-) açığa çıkmaktadır. Peroksinitrit reperfüze dokularda protein tirozin rezidülerini nitratlayarak 3-nitrotirozin (3-NT) oluşmasını sağlamaktadır. Potent oksidan ajan olan bu yapılar DNA fragmentasyonuna ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre hasarı meydana getirmektedirler [40].

Nitrozatif stres oluşumunda önemli bir ajan olan NO, L-Arjinin ve O_2 'den NOS'nin kataliziyle üretilmekte ve yan ürün olarak da L-Sitrulin açığa çıkmaktadır (Şekil 2.3). Oluşan NO'nun yarılanma ömrü 2–5 saniyedir.



Şekil 2.3. NO üretimi

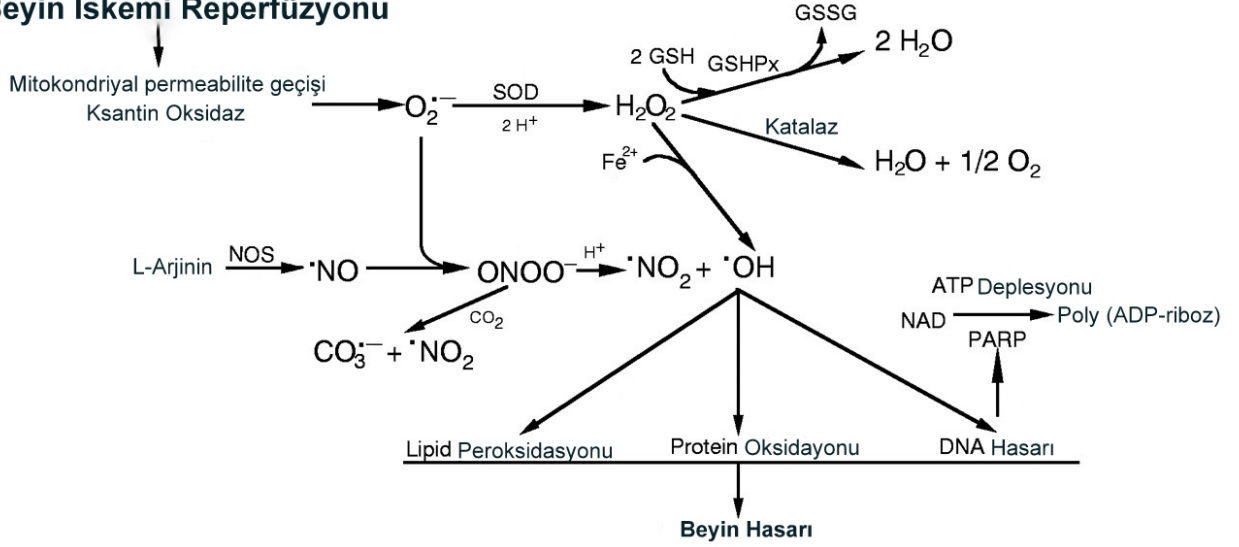
Nitrik oksit sentaz enziminin 3 tipi mevcuttur. Bu izoformlar nNOS, eNOS ve iNOS olarak bilinmektedir [17]. Nöronal NOS merkezi ve periferik sinir sistemi hücrelerinde görülür ve aktivasyonu CaMKII bağımlıdır. Nöronal NOS'nin merkezi sinir sisteminde dağılımı homojen değildir; serebellum, serebral korteks, hipotalamus, hipokampus ve amigdalada daha yoğun miktarda bulunmaktadır. Endotelial NOS, damar endotel hücrelerinde lokalizedir ve nNOS gibi CaMKII bağımlı aktiviteye sahiptir. Nöronal NOS ve eNOS konstitütif NOS (cNOS) olarak

da adlandırılmaktadırlar. İndüklenebilir NOS ise makrofajlarda bulunur ve cNOS'tan farklı olarak aktivitesi CaMKII bağımlı değildir [18].

Serebral İ/R sonrasında NO seviyesi belirgin biçimde artmaktadır. Bu artışın enfarkt alanına göçen astrosit ve nötrofillerdeki iNOS ve cNOS aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [42-44]. Nitrik oksit sentaz aktivitesi postiskemik Ca^{2+} artışına bağlı olarak da yükselmektedir. Deneysel serebral iskemi çalışmaları sonucunda postiskemik süreçte NOS izoformlarının kendi aralarında uzaysal ve zamansal farklılıklar göstererek arttığı tespit edilmiştir [19-21]. Sıçanlarda yapılan geçici serebral iskemi çalışmasında kortekste nNOS immünreaktif nöronların sayısı ilk 15 dakikada artmış ve ekspresyon 24 saat kadar devam etmiştir [19]. Kalıcı iskemide ise iskemik çekirdeğin serebral damarlarında eNOS ekspresyonu 24. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. İndüklenebilir NOS ekspresyonu da yerleşik ve göçen hücrelerde iskemiye cevap olarak indüklenmiştir [20, 21]. İndüklenebilir NOS artışının eNOS ve nNOS ekspresyonundan daha sonra oluşması erken hasara iNOS'un katkı yapmadığını göstermektedir. Serebral iskemide NOS izoformlarının parsiyel etkileri halen çözülebilmemiş değildir. Nöronal NOS knockout farelerde enfarkt hacminde azalma görülürken, eNOS knockout farelerde hasarın şiddetlendiği tespit edilmiştir [45, 46].

İskemik beyinde NO, demir-sülfür (4Fe-4S) proteiniyle tersinir olarak reaksiyona girerek inaktif 4Fe-4S-NO ürünlerini üretmekte ve mitokondriyal akonitaz, NAD-ubikinon oksidoredüktaz (Kompleks I), süksinat-ubikinon redüktaz (Kompleks II) inaktivasyonuna ve indirekt respirasyon inhibisyonuna sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra NO sitokrom oksidaza bağlanarak mitokondriyal solunum zincirini direkt olarak da inhibe edebilmektedir [47]. Kısaca NO, glikolitik ve mitokondriyal enzimleri inhibe edip nöronal enerji üretimini azaltarak, DNA fragmentasyonunu arttırmakta, süperoksitin peroksinitrite dönüşmesini sağlayarak ve toksik serbest radikallerin artışına yol açarak serebral hasarı amplifiye etmektedir [48]. Fokal serebral iskemide NOS inhibitörü olan L-NAME (L-NG-Nitroarjinin metil ester), L-NA (NG-nitro-L-arjinin) ve aminoguanidinin nöroprotektif olduğu gösterilmiştir [44, 49]. Buna karşılık, bazı koşullar altında artmış NO üretiminin nöroprotektif olduğu ve bu etkinin vazodilatasyona bağlı olabileceği bildirilmiştir [50]. Organizmada açığa çıkan NO oksihemoglobin ile reaksiyona girerek temizlenmekte ve bu reaksiyon sonucu nitrat (NO_3^-) açığa çıkmaktadır [2].

Beyin İskemi Reperfüzyonu



Şekil 2.4. Serebral iskemi reperfüzyon hasar mekanizması

2.1.4. Serebral İskemi Reperfüzyonda Antioksidan Savunma

Hücreler ROS ve RNS hasarına karşı kendilerini enzimatik ve nonenzimatik (vitamin C ve E) inaktivasyon ve degradasyon ile savunmaktadır [42]. Antioksidan sistemin primer enzimleri SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GPx) (Şekil 2.4).

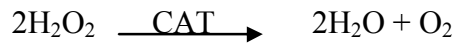
Süperoksit Dismutaz (SOD):

Süperoksit dismutaz enzimi homodimerik yapıda olan 32 kDa'lık bir proteindir. Süperoksit dismutaz iki tane $O_2^{\cdot-}$ anyonunu alarak H_2O_2 ve O_2 oluşturur.



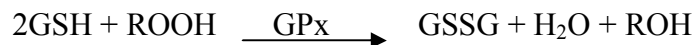
Katalaz (CAT):

Peroksidaz ailesinin üyesi olan CAT peroksidazlarda lokalizedir ve yapısında dört 'hem' grubu bulunduran 220 kDa ağırlığında bir hemoproteindir. Katalaz, H_2O_2 'yi O_2 ve suya parçalamaktadır.



Glutatyon Peroksidaz (GPx):

Tetramerik yapıda olan enzim, H_2O_2 ve büyük moleküllü hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizlemektedir [51].



Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (C Vitamini ve E Vitamini) :

Suda eriyen vitaminlerden olan C vitamini çok güçlü bir indirgeyici ajandır. ROO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, 1O_2 ve $ONOO^-$ ile kolayca reaksiyona girerek bunları ortamdan temizlemektedir. Ayrıca C vitamini tokoferoksil radikalini tokoferole indirgeyerek, yükseltgenmiş E vitamininin antioksidan özelliklerinin tekrar kazanılmasını sağlamaktadır. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirgemektedir. Peroksil radikalini (LOO^{\bullet}) yıkarak lipid peroksidasyonu sonlandırdığı için “zincir kırıcı antioksidan” olarak da tanımlanmaktadır [52].

2.1.5. Serebral İskemi Reperfüzyon ve Hücre Ölümü

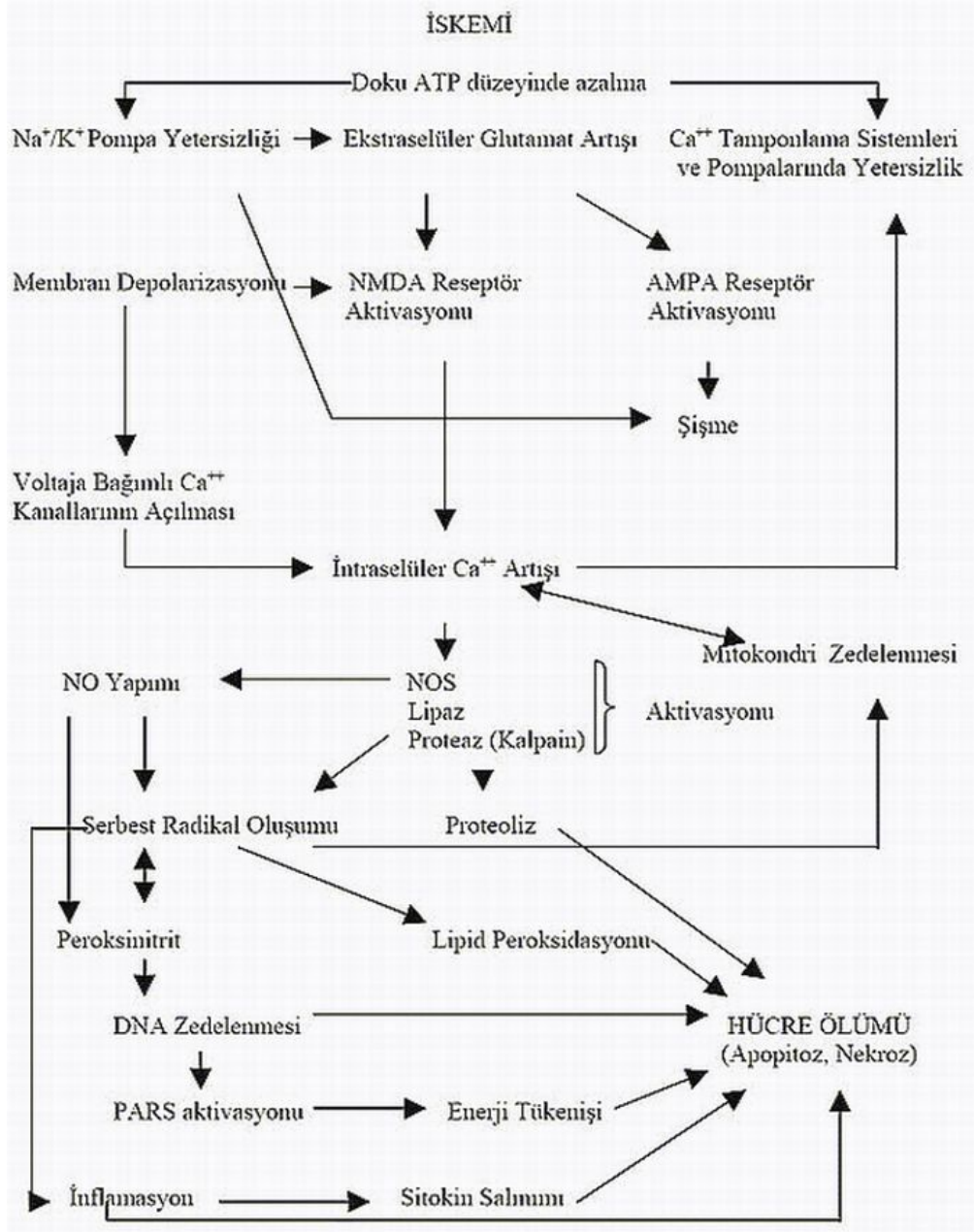
İskemi reperfüzyon, hücre hasarına ve hücre ölümüne sebep olan kaskadları tetikleyerek apoptozisi indüklemektedir (Şekil 2.5). Genelde programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, organizma tarafından hücrelerin yok edilmesinde kullanılan biyomoleküler bir süreçtir. Komşu hücreler için tehdit oluşturan enfekte hücreler, genetik hasara sahip hücreler, yaşlanmış immün hücreler veya I/R’de olduğu gibi strese maruz kalan hücreler apoptozise yol açmaktadır [53].

İskemi reperfüzyon sonrasında görülen bir diğer hücre ölümü ise apoptozisten tamamen farklı olan nekrozistir. Ekzojen bir etki sonucunda, programsız biçimde gerçekleşen nekrozisin temel olarak iki türü bulunmaktadır. İskemide en sık görülen, nekrozisteki hücrelerin dramatik şekilde büzülmesi ve elektron bakımından aşırı yoğun bir hal almasıdır. Daha nadir görülen tür ise, hücrelerin şişmesi ve organellerin formlarını yitirmesidir. Fokal serebral iskemide iskemik çekirdekteki nöronlar ağırlıklı olarak nekrotik iken, penumbra ve global serebral iskemide maruz kalmış beyin dokusunda apoptotik nöronların daha baskın olduğu tespit edilmiştir [3].

Genel olarak organizmada apoptozis ekstrensek ve intrinsek mekanizmalarla oluşmaktadır. Ekstrensek yolakta ölüm reseptörü aracılı sinyalizasyon etkin olup intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlar arasındaki iletişimde anahtar rolü oynayan plazma membranı üzerinde eksprese edilen ölüm reseptörleri apoptotik olayları başlatmaktadır. İntrensek yolakta ise mitokondri kaynaklı kaskadlar aktive olmakta ve Bcl-2 protein ailesi tarafından regüle edilmektedir [53].

Çok çeşitliliğin yanı sıra iskemik hücre ölümünün en önemli karakteristiği gecikmeli biçimde meydana gelmesidir. İskemik hücre hasarı, iskeminin üzerinden uzun bir zaman geçtikten sonra gerçekleşmekte ve bu olay gecikmiş nöron ölümü olarak bilinmektedir. Gecikme, iskemik etkinin doğasına ve etkilenen beyin bölgesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Gecikmiş nöron ölümü bazı durumlarda günleri, hatta haftaları alırken, bazı durumlarda ise birkaç saat veya daha kısa sürebilmektedir [4, 5, 54]. Gecikmiş nöron ölümüne yönelik yapılan çalışmalarda iskemi sonrasında hipokampal CA1 piramidal nöronları, striatumun orta büyüklükteki nöronları ve serebellumun Purkinje hücreleri gibi belirli nöron popülasyonlarının hasara çok daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Yapılardaki hassasiyet de kendi içinde iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin; hipokampal CA1 bölgesindeki nöronlar 3 – 5 dakika süreli

iskemide hasar görürken, striatumdaki orta büyüklükteki nöronlar 15 – 20 dakikalık iskemiye dayanabilmektedir. Kardiyak arrest sonrasında oluşan nöronal hasarın popülasyonlar arasındaki zamansal profili de farklılık göstermektedir. Başarılı bir resüsitasyonun 3 saat sonrasında striatumun orta büyüklükteki nöronlarında hasar gözlenirken, CA1 hipokampal nöronlarında hasar oluşması 48 – 72 saat sonrasına kadar uzayabilmektedir. Dolayısıyla, hipokampus İ/R’de önemli hasara uğrayan beyin bölgesi olarak karşımıza çıkmaktadır [1].



Şekil 2.5. İskemi genel hasar mekanizması

2.1.6. Serebral İskemi Reperfüzyonun Öğrenme ve Hafıza Üzerine Etkileri

Hipokampus insanlarda ve hayvanlarda I/R'nin nörodejeneratif etkilerine karşı en fazla duyarlılığa sahip olan beyin bölgesidir [55-57]. Geçici global serebral iskeminin en belirgin semptomu davranışsal ve kognitif bozulmalardır [58, 59]. Geçici serebral iskeminin kemirgenlerde oluşturulan modellerinde uzaysal öğrenme ve hafıza bozukluğu üzerinde en çok durulan parametrelerdir. Dolayısıyla, iskemik beyin hasarını tedavi etmeye yönelik ilaçların pre-klinik potansiyeli, bu ilaçların uzun vadeli fonksiyonel ve davranışsal etkilerine bakılarak belirlenmektedir [60].

Geçici ön beyin iskemisine maruz kalan sıçanlarda özellikle hipokampal CA1 bölgesinde nöronal hasar olduğu ve hafızada bozulma meydana geldiği tespit edilmiştir [61-66]. Kumaran ve arkadaşlarının [67] yaptığı çalışmada da 20 dakikalık global serebral iskeminin öğrenme ve hafızada bozulmalara sebep olduğu davranış deneyleriyle ortaya konmuş, postiskemik dokuzuncu günde hipokampal CA1 bölgesinde oldukça fazla apoptotik nöron olduğu ve iNOS ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. In vivo modellerin yanı sıra in vitro iskemi çalışmaları ile oksijen glukoz yoksunluğunun, sinaptik iletinin verimini ve fizyolojik LTP ekspresyonunu engelleyerek veya glutamat aracılı sinaptik iletimde güçlenme (postiskemik LTP) sağlayarak düşürdüğü gösterilmiştir [68, 69].

2.2. Öğrenme ve Hafıza

Memelilerde davranışın belirlenmesindeki en önemli etken çevresel şartlar hakkında yeni bilgiler edinilmesi ve bu bilgilerin saklanmasıdır. Öğrenme, çevre hakkında bilgi edinilmesi işlemi; hafıza ise edinilen bilgilerin tekrar hatırlanabilecek bir biçimde şifrelenerek depolanmasıdır [70]. Hafıza, kalıcılık süresine ve içeriğine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.6).

Kalıcılık Süresine Göre Hafıza Türleri

Öğrenilen bilginin ne kadar süre ile hafızada tutulduğuna dayanarak uzun süreli hafıza ve kısa süreli hafıza türleri tanımlanmıştır.

1. Uzun süreli hafıza (LTM – Long term memory) edinilen bilginin yıllarca, hatta yaşam boyu depolandığı hafıza türüdür.
2. Kısa süreli hafıza (STM – Short term memory) kısa sürede kazanılan bilginin birkaç saat kadar hatırlanabildiği hafıza türüdür.

Öğrenilmiş bir bilgiye dayanan girişim planlanırken bilgiyi hazır tutan kısa süreli hafıza tipine çalışan hafıza (working memory) denmektedir. Kısa süreli hafızada edinilmiş bilgi travmalara veya çeşitli ilaçlara bağlı olarak bozulabilirken, uzun süreli hafıza bozulmaya karşı belirgin olarak dirençlidir [70, 71].

İçeriğine Göre Hafıza Türleri

İçeriğine göre hafıza temel olarak ikiye ayrılmıştır: implisit (dekleratif olmayan, refleksif) hafıza ve eksplisit (dekleratif) hafıza.

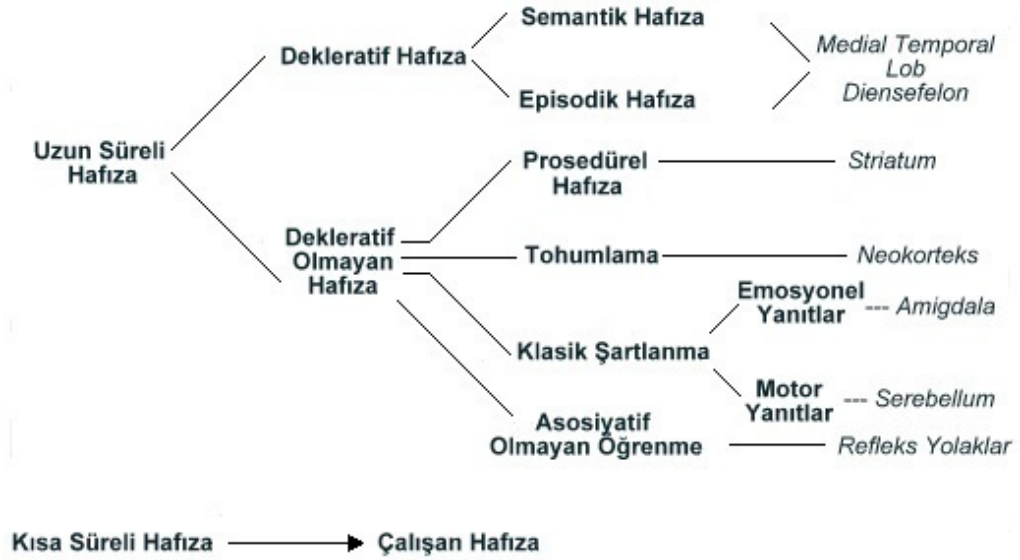
İmplicit Hafıza

İmplicit hafıza, bir kez kazanıldıktan sonra otomatik olarak gerçekleşen beceri ve alışkanlıkları kapsar. Bu hafıza türü fazla esneklik göstermez, katıdır ve öğrenmenin gerçekleştiği orijinal uyaran koşullarına sıkı sıkıya bağlıdır. İmplicit hafızanın tohumlama, prosedürel, asosiyatif ve asosiyatif olmayan olmak üzere dört alt türü mevcuttur. Tohumlama; daha önce karşılaşılmış olan sözcük veya cisimlerin tanınmasını kolaylaştıran hafıza türüdür. Tohumlama için verilebilecek en tipik örnek ilk birkaç harfinin söylenilmesi sonucunda bir sözcüğün daha kolay hatırlanmasıdır. Prosedürel hafıza; bilginin uzun süreli kullanımından sonra ilgili davranışların alışkanlık ve beceri haline gelmesidir. Belli bir aktiviteyi aynı aşamalarla uzun bir süre gerçekleştirmekle oluşur. Araba kullanmak prosedürel hafızaya örnek olarak gösterilebilir. Asosiyatif öğrenmede ise organizma bir uyarının diğer bir uyaran ile olan ilişkisini öğrenir. Asosiyatif öğrenme klasik şartlanma ve operan şartlanma olarak iki grupta incelenmektedir. Klasik şartlanma, önceden belirli bir yanıt oluşturmayan veya çok hafif bir yanıt oluşturan uyaran (koşullu uyaran – conditioned stimulus CS) ile bu yanıtı doğal olarak uyandıran bir diğer uyarının (koşulsuz uyaran – unconditioned stimulus US) tekrar tekrar eşleştirilmesi ile kazanılan bir refleks yanıtıdır. Koşullu uyaran ve US yeterli sayıda eşleştirildikten sonra CS, başlangıçta sadece US tarafından ortaya çıkarılan yanıtı uyandırır. Klasik şartlanmada CS'nin US'den önce gelmesi zorunludur. Operan şartlanmada ise, organizma bir ödül elde etmek veya cezadan sakınmak için bazı görevleri öğrenir. Burada US, iyi veya kötü bir olay; CS, organizmanın görevini yapması için uyaran işarettir. Operan şartlanmaya deneğin ayağına gelecek elektrik şokunu bir çubuğa basarak önleyebileceğini öğrenmesi veya deneğin bir pedala basarak kafese yem gelmesini sağlayabileceğini öğrenmesi örnek olarak verilebilir [70, 71]. Asosiyatif olmayan öğrenmede organizma tek bir dürtü ile öğrenir. Bu öğrenme türü alışkanlık (habitüasyon) ve duyarlanma (sensitizasyon) olarak ikiye ayrılır. Alışkanlık, nötral (zararsız) bir uyarının defalarca yinelenmesiyle oluşan en basit öğrenme formudur. Bir uyarı ilk kez uygulandığında organizma bir tepki oluşturur. Uyaran tekrarlandığında giderek daha az elektrikselsel yanıt oluşur ve organizmanın uyarana alışması durumu gerçekleşir. Gürültülü bir ortama girildikten bir süre sonra gürültünün daha az duyulması alışma için verilebilecek güzel bir örnektir [70, 71]. Duyarlanma alışkanlığın bir bakıma tersidir. Zararlı bir uyarıdan sonra gelen uyarılara verilen yanıt beklenenden daha şiddetli olur [80].

Eksplisit Hafıza

Dekleratif hafıza veya tanıma hafızası olarak da adlandırılan eksplisit hafıza implicit hafızadan farklı olarak karmaşık, bilince eşlenik, esnek ve değişmeye açıktır. Bilgi hipokampus ile beynin medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolanmaktadır. İnsanlar, mekanlar ve tarih gibi çeşitli bilgi türleriyle ilişkili olup semantik ve episodik hafıza olarak ikiye ayrılmaktadır. Semantik hafıza genel kabul gören bilgileri kapsarken, episodik hafıza kişisel deneyim ve olaylara ilişkin bilgileri içermektedir. Semantik ve episodik hafızanın oluşumu için birbiriyle ilişki içinde fakat ayrı olan en az dört işlem gerekmektedir. Bu işlemler sırasıyla kodlama (encoding), pekiştirme (consolidation), depolama (storage) ve geri çağırma (retrieval). Kodlama, ilk defa karşılaşılan bilginin işlenip hafızaya alınma sürecidir. Bu işlemin kapsamı ve doğası öğrenilen bilginin ilerleyen zamanlarda ne kadar iyi hatırlanabileceğinin belirlenmesinde kritik önem taşımaktadır. Pekiştirme, yeni

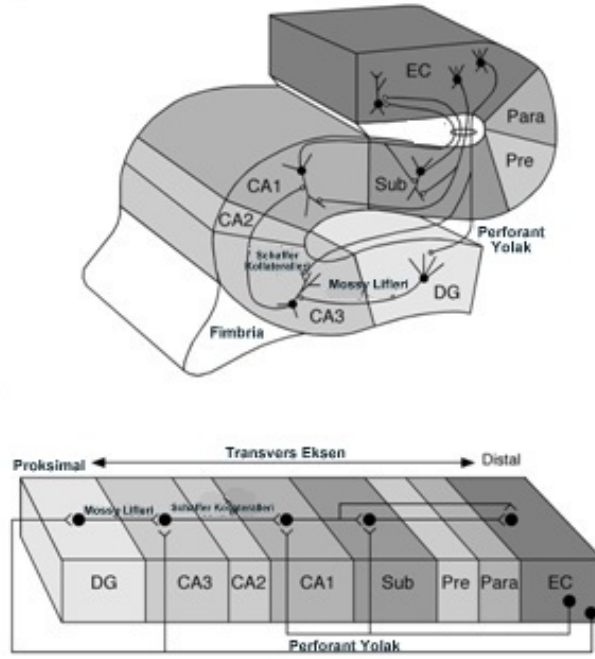
kodlanmış ve henüz yerleşmemiş olan bilgilerin uzun süreli depolanabilmesi, daha yerleşik duruma getirilmesi için gereken işlemleri kapsamaktadır. Depolama, hafızanın uzun süre boyunca korunmasını sağlayan mekanizmalardan oluşmaktadır. Geri Çağırma ise, depolanan bilgilerin hatırlanması ve kullanılmasıdır.



Şekil 2.6. Uzun ve kısa süreli hafıza türleri

Hafıza beynin çeşitli bölgelerinin integrasyonunu gerektiren kompleks bir işlemdir ve farklı hafıza işlemlerinde bazı serebral bölgeler diğer bölgelerden daha baskın görevlere sahiptir (Şekil 2.6).

İnsanlar ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda eksplisit hafıza sürecinde prefrontal, limbik veya parieto-oksipito-temporal korteksler aracılığıyla bilginin görsel, işitsel ve somatik biçimde işlenerek kazanıldığı gösterilmiştir. Alınan bilgi sırasıyla parahipokampal korteks, perirhinal korteks, entorhinal korteks, dentat girus, hipokampus, subikuluma aktarılmakta ve tekrar entorhinal kortekse taşınmaktadır (Şekil 2.7). Bilginin entorhinal korteksten parahipokampal korteks, perirhinal korteks ve son olarak da neokorteksin polimodal asosiyasyon alanlarına geri gönderilmesiyle depolama süreci tamamlanmaktadır [70, 72].



Şekil 2.7. Hipokampal yolaklar

Bilgi depolama sürecinde entorhinal korteks hipokampus için hem giriş hem de çıkış sağlayarak çift yönlü işlev görmektedir. Polimodal asosiasyon kortekslerinden hipokampusa gelen bilgiler ve hipokampustan polimodal asosiasyon kortekslerine giden bilgiler entorhinal kortekste entegre edilmektedir. Bu durum entorhinal korteks hasarının sadece belirli bir alanda değil, hemen hemen tüm duysal modalitelerde onarılamaz ciddi hafıza bozulmalarına nasıl yol açtığını açıklamaktadır [70].

Kognitif işlemlerde beynin pek çok bölgesi görev alırken, belirli öğrenme ve hafıza türlerinde hipokampus kilit rol oynamaktadır. Hipokampusun özellikle episodik ve uzaysal hafıza tiplerinde önemli olduğu bilinmektedir [73]. Sıçanlarda ve farelerde oluşturulan hipokampal lezyonların uzaysal hafızada hasar yarattığı ve hipokampustaki hücrelerin her birinin spesifik bir uzaysal bilgiyi kodladığı tespit edilmiştir.

Uzaysal bilgi tüm hayvan türlerinde görülen içgüdüsel bir davranış olan araştırma, keşfetme davranışıyla kazanılır. Bu davranış tipi yeni bir uyarana yanıt veya doğal bir merak ifadesi olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, uzaysal hafıza objelerin veya spesifik yolların yerleşimi hakkındaki bilgiyi kodlama, pekiştirme, depolama ve geri çağırmadan sorumlu beyin fonksiyonu olarak tanımlanabilmektedir [74].

2.2.1. Hipokampusun Yapısı

Hipokampus, hipokampal formasyon adı verilen ve dentat girus, hipokampus proper, subikulum, presubikulum, parasubikulum ve entorhinal korteksten oluşan yapının önemli bir parçasıdır. İnsan hipokampusu, primat hipokampusu ve sıçan

hipokampusu nöronal organizasyon ve fonksiyonları açısından benzerlik gösterebilir de morfolojik olarak aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. İnsan ve primat hipokampal formasyonları serebral korteksin baskısıyla temporal lob içine gömülü, lineer ve transvers bir pozisyona sahipken, sıçanlardaki hipokampal formasyon orta hatta yakın çekirdeklerden başlayıp talamusun üzerinden temporal loba kadar uzanmakta ve C şeklinde vertikal bir duruş sergilemektedir [72]. 1934 yılında CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan dört hipokampal alt birim tanımlanmıştır. Bu birimler yapısal olarak bazı farklılıklara sahiptir ve her birinin girdi ve çıktı alanları ayrıdır.

Hipokampusta üç majör nöronal yolak bulunmaktadır. Bunlar; perforant, Mossy fiber ve Schaffer kollateral yollarıdır. Perforant yolak entorhinal korteksten dentat girusun granül hücrelerine projekte olur. Mossy fiber yolağı granül hücrelerinin aksonlarından başlar ve CA3'teki piramidal nöronlara bağlanır. Schaffer kollateral yolağı ile de CA3'teki piramidal nöronların eksitator kollateralleri CA1'deki piramidal nöronlara uzanır.

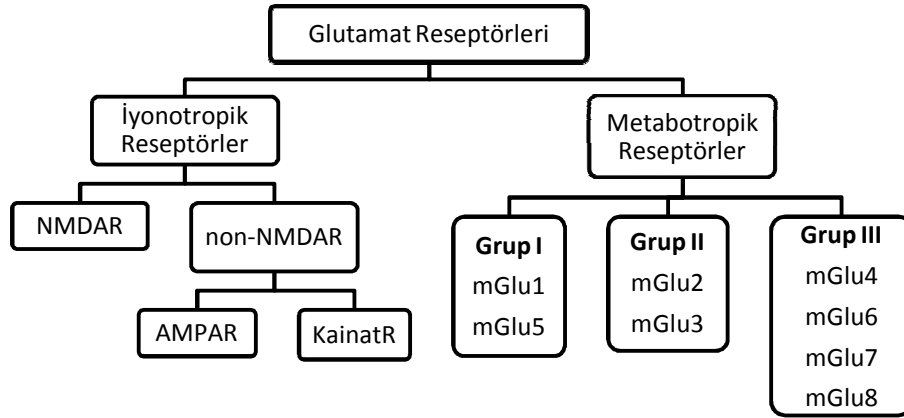
1973 yılında Bliss ve Lomo [75] tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada hipokampustaki nöronal yolların daha önce gerçekleşen aktivitelere karşı oldukça duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, anestezi altındaki tavşanda perforant yolağına yüksek frekanslı stimulus uygulamış ve dentat girustan ekstrasellüler eksitator post sinaptik potansiyel (EPSP) kaydı almışlardır. Kayıtları değerlendirdiklerinde EPSP sayısının arttığını, eşik değerin azaldığını ve bu değişimin bir saat kadar korunduğunu tespit etmişlerdir [75]. İlerleyen zamanlarda konunun üzerine gidilerek anestezi altında olmayan hayvanlarda da çalışmalar yapılmış ve hipokampusun her üç yolağında da yüksek frekanslı uyarıya bağlı olarak sinaptik etkinliğin arttığı ve haftalar hatta aylar boyu sürebildiği belirlenmiştir. Sinaptik etkinlikte meydana gelen bu değişim uzun süreli güçlenme (LTP) olarak adlandırılmıştır [75, 76].

2.2.2. Uzun Süreli Güçlenme (LTP)

Uzun süreli güçlenme, nöronların uyarana karşı cevabını değiştirebilme yeteneği olan nöronal plastisitenin ve yine aynı şekilde sinapslardaki değişim olan sinaptik plastisitenin altında yatan en önemli olgulardan biridir [14]. Öğrenme ve hafıza depolanması ile de ilişkili olduğu düşünülen LTP belirgin olarak hipokampusta görülse de serebellum, neokortikal alanlar, subkortikal alanlar gibi beynin diğer bölgelerinde de oluşmaktadır [76].

LTP oluşumunda Rol Alan Reseptörler

Glutamat, LTP'nin oluşma ve devam etme sürecinde rol alan temel nörotransmitterdir ve etkilerini reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Bilindiği üzere glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. İyonotropik reseptörler glutamatın bağlanması ile bir kanal haline gelerek intrasellüler ortama iyon girişini sağlamaktadır. Metabotropik reseptörler ise glutamatın bağlanmasıyla ikincil haberci sistemi kullanarak bazı hücre içi sinyal mekanizmalarını tetikleyerek işlev görmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Glutamat Reseptörleri

LTP'nin Özellikleri

Uzun süreli güçlenmenin oluşma ve korunma mekanizmaları sinapstan sinapsa değişkenlik göstermektedir [77]. Örneğin, Mossy fiber yolağındaki dentat girusun granül hücrelerinde ve CA3 postsinaptik piramidal nöronlarında NMDA reseptörlerinin sinaptik plastisitedeki rolü çok az olduğundan NMDA blokajı LTP indüksiyonunu engellemezken, Schaffer kollaterallerinde LTP oluşumu NMDA reseptörü aktivasyonuna bağlıdır. Hipokampal CA1 bölgesindeki LTP'nin NMDA reseptörlerinden ileri gelen iki önemli özelliği bulunmaktadır. Bu özellikler kooperativite ve asosiyativite olarak adlandırılmaktadır. Kooperativite, birden çok afferent aksonun eş zamanlı aktivasyonu, asosiyativite ise hem presinaptik nöronun hem de post sinaptik nöronun eş zamanlı aktivasyonu olarak tanımlanmaktadır [70]. Hipokampal sinapslar tek başlarına gerekli postsinaptik aktivasyonu oluşturamadıkları için birden çok aksonun eş zamanlı ateşlenmesi ile postsinaptik hücre güçlü şekilde aktive edilmektedir. Asosiyativite özelliğinin sağladığı avantaj da, LTP'yi indüklemeye yetmeyecek bir uyarının, daha güçlü bir başka uyarı ile güçlenerek LTP'yi indükleyebilmesidir. Bunun yanı sıra LTP girdiye özgü bir oluşum olup güçlenme sadece aktive olmuş nöronlarla yapılan sinapslarda oluşmaktadır [78].

2.2.3. LTP'nin Moleküler Mekanizmaları

Memelilerde hafıza depolanabilmesi için gerekli olan LTP iki fazda incelenmektedir. Bunlardan ilki LTP oluşumunu tetikleyen safhayı kapsayan Schaffer ve Mossy fiber yollarında farklılıklar gösteren süreçtir ve bu sürece LTP'nin erken fazı denmektedir. İkincisi ise indüklenmiş LTP'nin devamlılığının sağlandığı süreçtir ve LTP'nin geç fazı olarak adlandırılmaktadır.

LTP – Erken Faz

Presinaptik terminalden afferent bir uyarıyla sinaptik boşluğa salınan glutamat post sinaptik membrandaki NMDA ve AMPA reseptörlerine bağlanır (Şekil 2.9 A). Postsinaptik membran dinlenme durumundayken NMDA reseptörleri Mg^{2+}

blokajına bağılı olarak iyon geçişine izin vermez. Postsinaptik membran AMPA reseptörü aracılığıyla depolarize olduğunda NMDA reseptörlerindeki Mg^{2+} atılır ve reseptör kanal formunu alarak Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarına geçirgen hale gelir. Kalsiyum inflaksı sonucu Ca^{2+} bağımlı CaMKII, PKC ve tirozin kinaz enzimleri aktive olur. CaMKII enzimi AMPA reseptörlerini fosforile ederek hem bu reseptörlerin glutamat duyarlılığını arttırır hem de pasif durumdaki AMPA reseptörlerinin aktif duruma gelmesini sağlar [77]. Bunun dışında CaMKII, NOS enzimlerini de aktive ederek NO oluşmasını sağlar (şekil 2.9 B). Nitrik oksitin postsinaptik nörondan presinaptik nörona retrograd haberci olarak geçmesi daha fazla glutamatın sinaptik aralığa salınmasına neden olduğu düşünölmektedir [70].

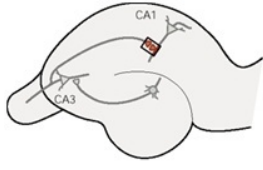
LTP – Geç Faz

LTP indüksiyonu sağlandıktan sonra uyarının devam etmesi halinde postsinaptik nöronda artan intrasellöler Ca^{2+} AC enzimini aktif hale getirir. Adenilil siklaz aktive olduktan sonra cAMP konsantrasyonunu arttırarak cAMP kinaz aktivasyonuna sebep olur. Aktif cAMP kinaz nükleus içine geçerek CREB proteinini fosforile eder. CREB aracılığıyla yapısal değişikliklerden sorumlu birimler aktive olur. Geç fazda görölen protein ve RNA sentezi erken fazdan farklı olarak görölen en belirgin özelliktir.

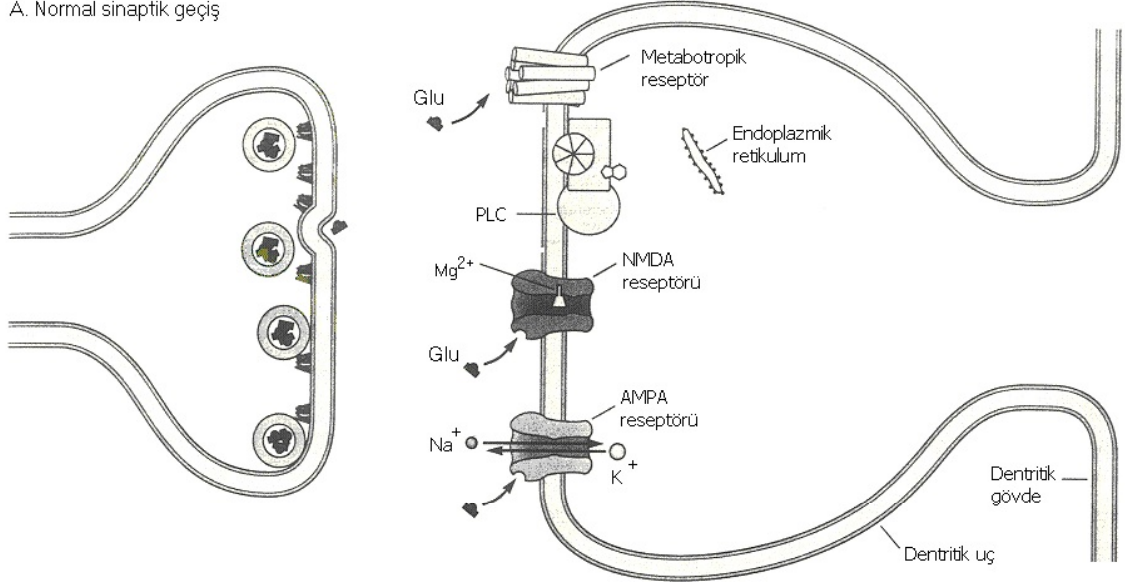
2.2.4. LTD – Uzun Süreli Azalma

Uzun süreli azalma (LTD) LTP'nin tam tersine sinaptik etkinliğin uzun bir süre boyunca azalması olarak tanımlanmıştır. LTD indüksiyonunun temel mekanizması düşük frekanslı (1 Hz gibi) stimulusların ard arda uygulanmasına dayanmaktadır [79]. İki farklı LTD formu bulunmaktadır. İlk LTD formu olan “depotansiyelizasyon” LTP'nin terse çevrilmesidir. Diğer form ise de novo LTD olarak adlandırılmıştır. De novo LTD, güçlenmemiş bir sinapsın sinaptik etkinliğinin bazal seviyenin altına inmesidir. LTD formları genellikle NMDA reseptörüne bağımlıdır ve düşük postsinaptik Ca^{2+} konsantrasyonu ile tetiklenir. Kalsiyuma cevap veren bazı fosfatazlar LTD mekanizmasında efektör molekül olarak görev yapmakta ve glutamat reseptörleri gibi kinazların fosforile ettiği yapıları ve kinazları defosforile etmektedirler.

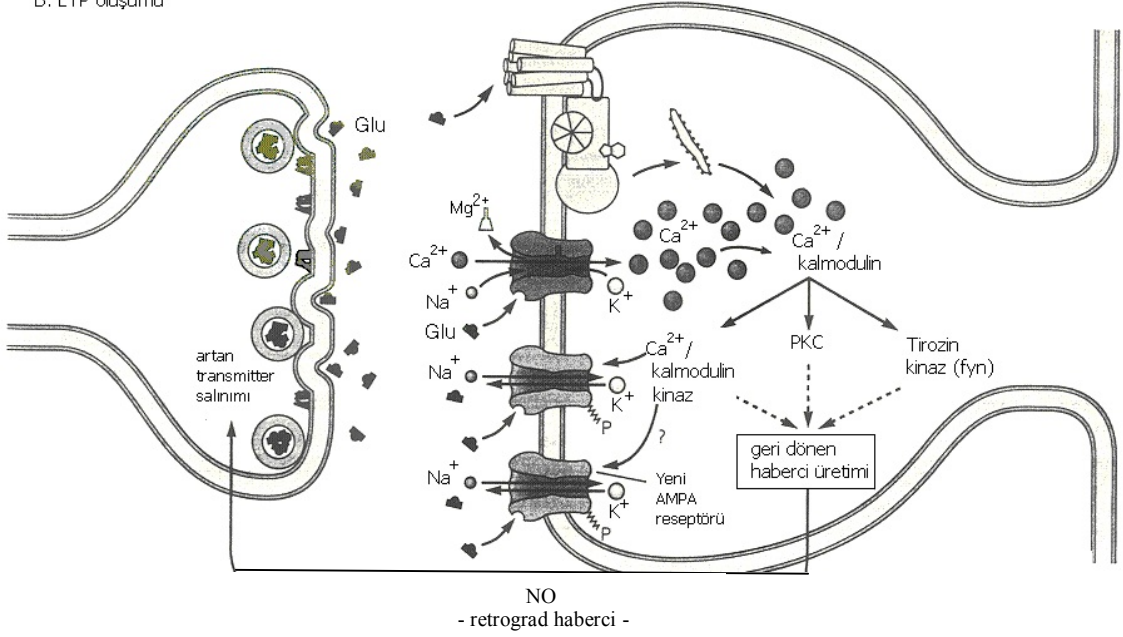
LTD'nin merkezi sinir sisteminde öğrenmeye bağılı sinaptik satürasyonun engellenmesi için homeostatik bir mekanizma olduğu ve bunun yanı sıra öğrenilen bilgilerin unutulmasını veya becerilerin azalmasını sağladığı düşünölmektedir [80] [81].



A. Normal sinaptik geçiş



B. LTP oluşumu



Şekil 2.9. Normal sinaptik ileti ve LTP

2.2.5. Deneysel Öğrenme Modelleri

Uzaysal hafızanın incelenmesinde hayvan modelleri oldukça önemli bir yere sahiptir. Deneysel hayvanlarında uzaysal hafıza çeşitli testlerle değerlendirilmektedir.

Klasik Labirent Testi:

Sıçanlarla yapılan öğrenme deneylerinde sıklıkla kullanılan düzenekler klasik labirentlerdir. Klasik labirentler dikdörtgen veya kare şeklinde olup pek çok yatay ve dikey duvardan oluşmaktadır. Protokoller sıçanın labirente gizlenmiş ödülü bulmaları esasına dayanmaktadır. Başlangıç kapısının açılmasıyla sıçan labirente alınmaktadır. Sıçanın başka bir uca yerleştirilen ödüle yanlış bir kola girmeden kaçınıcı oturumda, ne kadar sürede ulaştığı, oturum sayısı arttıkça bu sürenin değişimi kaydedilip analiz edilmektedir. Oturumlar boyunca yapılan hataların zamana bağlı grafikleri çizilerek sıçanın öğrenme profili çıkarılmaktadır.

T – Labirent Testi:

Spontan alternasyon ve uzaysal hafıza analizlerinde en çok kullanılan testlerden biri T-Labirent testidir. Test düzeneği T şeklinde plastik veya ahşaptan yapılmış, tercihen koyu mat siyah renkte bir labirentten oluşmaktadır. Kollardan bir tanesi “başlangıç kolu” olarak adlandırılmakta ve sıçanlar düzeneğe bu koldan bırakılmaktadır. T-Labirent testinde en sık kullanılan yöntem ödüllendirilmez. Başlangıç kolu dışındaki kollardan birine ödül olarak yem konur ve sıçan başlangıç kolundan labirente bırakılıp kaç oturum sonra ödülün bulunduğu kola girdiği kaydedilmektedir. Daha sonra yem koldan alınır ve tekrarlanan oturumlarda sıçanın ödül bulunan kola girme oranı ölçülür.

Y – Labirent Testi:

Spontan alternasyon ve uzaysal hafıza analizinde kullanılan bir başka test de Y-Labirent testidir. T-Labirentinden farklı olarak üç kolu da birbirine eştir ve kolları birleştiren köşeler daha yumuşak olduğu için T-labirent testine göre daha kolay olduğu düşünülmektedir. T-labirent testindeki ödüle dayalı yöntemlere ek olarak Y-labirent testinde değişiklikleri algılama ve araştırma davranışlarına yönelik protokoller yer almaktadır. Birbirine eş üç koldan bir tanesi kapatılır, bu kola “yeni kol” denmektedir. Sıçana “başlangıç kolu” ve “diğer kol” denilen iki kolda dolaşması için on beş dakika verilmektedir. Dört saat geçtikten sonra yeni kol açılarak, beş dakikalık kayıt oturumu için sıçan başlangıç kolundan labirente konulmaktadır. Sıçanın yeni kola girme oranı, bu kolda kalma süresi ve kat ettiği mesafe değerlendirmeye alınmaktadır.

Radial Kol Labirent Testi:

Kısa süreli hafızanın değerlendirilmesi amacıyla kullanılan çok kollu bir labirent sistemidir. Dairesel merkezden çıkan birbirine eş sekiz, on iki veya on altı koldan meydana gelmektedir. Kısa süreli hafızayı test edebilmek için her bir kolun uç kısmına yem konulmaktadır. Sıçan merkeze bırakıldıktan sonra kısa süreli hafızasını ve çevredeki uzaysal ip uçlarını kullanarak hangi kola girip girmediğini hatırlaması beklenmektedir. Eğer sıçan bir kola girip oradaki yemi yedikten sonra o

kola bir daha girerse bu bir hata olarak kaydedilmektedir. Sıçanın labirentteki performansına bakılarak kısa süreli hafızasının durumu değerlendirilmektedir.

Morris Su Tankı Testi:

Uzaysal hafıza ve öğrenme testlerinden biridir. Morris su tankı testi kokuya dayalı ipucu bulundurmaması ve sıçana daha fazla kaçış alanı sağlaması sebepleriyle labirent testlerine göre daha avantajlıdır. Testin düzeneği opak plastik veya metal bir maddeden yapılmış, 40 cm derinliğinde içi su dolu yuvarlak bir tank ve çeşitli platformlardan oluşmaktadır. Bu test için çok sayıda protokol bulunmaktadır. En çok uygulanan protokolda ise tanktaki su toksik olmayan bir boyayla boyanarak opaklaştırılmakta, tanka suyun 1-2 cm altında kalacak bir platform yerleştirilmektedir. Sıçan suya bırakıldıktan sonra çevredeki uzaysal ipuçlarını kullanarak platformu bulma latansı, yüzme mesafesi ve yüzme hızı gibi parametreler değerlendirmeye alınmaktadır. Hipokampus bağımlı uzaysal hafıza analizinde en çok kullanılan test Morris su tankı testidir.

Açık Alan Testi:

Açık alan testi sıçanlarda lokomotor aktiviteyi, araştırmaya dayalı ve anksiyete içerikli davranışları analiz etmek amacıyla kullanılmaktadır. Testte plastik veya ahşaptan yapılmış yaklaşık 30 cm derinliğinde kare veya yuvarlak bir tank kullanılmaktadır. İncelenmek istenen parametreye yönelik çeşitli protokoller bulunmaktadır. Anksiyete değerlendirmesinde sıçanın açık alanın merkez ve kenarlarında geçirdiği zaman ele alınmaktadır.

2.3. Ghrelin

Ghrelin majör olarak midede üretilen, 28-amino asitten oluşan, büyüme hormonu (GH) salıcı etkisi olan bir peptid hormondur. Ghrelinin keşfinden önce büyüme hormonu sekretegogları (GHS) olarak adlandırılan peptidil ve non-peptidil büyüme hormonu salıcı etki gösteren sentetik yapılar geliştirilmiştir. Çeşitli çalışmalara dayanarak GHS'ler için reseptör bağlanma bölgelerinin büyüme hormonu salıcı hormon (GHRH) reseptörlerinden farklı olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar GHS ve GHRH'nin farklı mekanizmalar ile GH salıcı etki gösterdiklerini işaret etmiştir. Bu sebeple, bilim dünyası için GHRH'nin hücre içi cAMP'yi, GHS'nin ise hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı sonucu şaşırtıcı olmamıştır. Tüm bu veriler doğrultusunda GHSR'leri aktive edecek henüz tanımlanmamış bir hormon olabileceği fikri ortaya konmuştur. Uzun süren çalışmalardan sonra, 1999 yılında Kojima ve arkadaşları [25] GHSR için doğal bir ligand olan ghrelini keşfettiklerini açıklamışlardır.

Ghrelinin açile ve deaçile olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Açile ghrelin 28 aminoasitlik peptidin 3. amino asidi olan serine (Ser3) n-oktanoil bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Deaçile-ghrelinde ise açil bağlanması görülmemekte ve amino asit dizilimi GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.10). Açile ghrelin, bir yağ asidi tarafından modifiye edildiği belirlenen ilk peptid hormondur. Bu posttranslasyonel modifikasyonun ghrelinin etkileri için oldukça kritik bir aşama olduğu düşünülmektedir. Günümüzde açile-ghrelin aktif form, deaçile-ghrelin inaktif form olarak bilinmektedir. Literatürde

deaçile-ghrelinin inaktif olmadığını iddia eden çalışmalara rastlanmakla birlikte, deaçile-ghrelinin etkileri ve mekanizmalarına dair henüz bir kanıt bulunmamaktadır. Erişkinlerde açile-ghrelinin plazma konsantrasyonu 10 – 30 fmol/ml, deaçile-ghrelinin plazma konsantrasyonu ise 90 – 110 fmol/ml seviyesindedir [25].



Şekil 2.10. Ghrelin'in Moleküler Yapısı

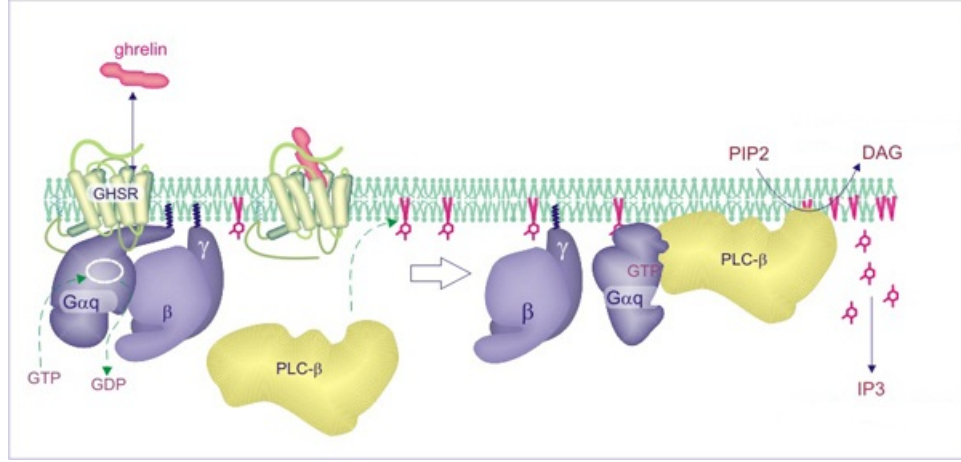
2.3.1. Ghrelin Reseptörleri

Büyüme hormonu sekretegog reseptörü kromozomal lokasyonu 3q26.2. olan tek bir gen tarafından kodlanmaktadır. Alternatif mRNA süreçleri 2 tip GHSR üretmektedir: GHSR-1a ve GHSR-1b [82]. Büyüme hormonu sekretegog reseptörü – 1a 366 aminoasit ve 7 transmembran bölgeye sahip olan G-protein bağlı bir reseptördür. GHSR-1a'nın GHS ile stimülasyonu PLC, diaçil gliserol (DAG)/ inozitol trifosfat (IP3) yolağını tetikleyerek hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (Şekil 2.11). Ayrıca GHSR-1a aktivasyonu potasyum kanallarını inhibe ederek voltaj kapılı L- ve T- tipi kalsiyum kanallarından hücre içine kalsiyum girişini sağlamaktadır. Buna zıt olarak GHSR-1b reseptörü 289 aminoasitten oluşup 5 transmembran domaine sahiptir. GHSR-1b'nin fonksiyonel bir reseptör olup olmadığı halen tartışma konusudur. Fakat, GHSR-1a ve GHSR-1b arasındaki yapısal farklılıklar ve sentetik GHS'lerin veya ghrelinin GHSR-1b'ye bağlanamaması göz önünde bulundurulduğunda GHSR sinyal yolağını modüle edebilecek başka ligand(lar) olabileceği gerçeği akla gelmektedir. Yakın zamanlarda Hosoda ve arkadaşlarının [26] post-translasyonel süreçte ghrelin deriveli pek çok molekül olduğunu belirlemeleri bu düşüncüyü güçlendirmektedir.

2.3.2. Ghrelinin Lokalizasyonu

Ghrelin lokalizasyonunun en yoğun olduğu bölge gastrointestinal kanaldır. In situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal analizler, X/A benzeri hücre olarak bilinen ghrelin içeren hücrelerin, insan ve sıçanların oksintik bezlerinde bulunan asit üreten hücrelerden farklı bir endokrin hücre tipi olduğunu göstermiştir. X/A benzeri hücreler ghrelin proteini içeren veziküller ve elektron yoğunluğu bulunan granüller sentezlerler. Normal erişkin plazma örneklerinde 100-120 fmol/ml total ghrelin bulunması, ghrelin sekresyonunun gastrointestinal kanala değil, sistemik dolaşıma yapıldığını ve bu sayede ghrelinin endokrin, parakrin ve otkrin etkilerinin bulunabileceğini göstermiştir. Her ne kadar dolaşımdaki ghrelinin büyük miktarı mide kaynaklı olsa da, ghrelinin eser miktarlarda hipofiz, akciğer, pankreas,

özefagus, karaciğer, tiroid, kalp, kolon gibi başka dokularda da sentezlendiği keşfedilmiştir [82].



Şekil 2.11. Ghrelinin reseptörü üzerinden etki mekanizması

2.3.3. Ghrelinin Fizyolojik Etkileri

Gastrointestinal Fonksiyonlar

Ghrelin intravenöz olarak uygulandığında doz bağımlı bir şekilde mide asit sekresyonunu ve mide hareketini arttırmaktadır. Bilateral servikal vagotomi yapıldığında ghrelinin gastrik etkilerinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir [83, 84]. Yapılan çalışmalarda vagal afferent nöronlarda ghrelin reseptörlerine rastlanmış ve midede bulunan ghrelinin nervus vagus aracılığıyla beyinde sinyaller oluşturduğu öne sürülmüştür [85-87]. Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda ghrelinin etki mekanizmasında vagal sistemin büyük bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Kardiyovasküler Fonksiyonlar

Ghrelinin kardiyovasküler sistemdeki varlığı bir tür işaretleme metodu olan “radiolabelling” ile gösterilmiştir. İşaretlenen ghrelin moleküllerinden alınan sinyaller sayesinde ghrelinin bu sistemdeki lokalizasyonu incelenmiş, kalbe ve periferel vasküler dokuya bağlandığı tespit edilmiştir. Ghrelinin kalpte en çok aterosklerotik bölgelerde lokalize olması, ateroskleroz gelişiminde ghrelinin fonksiyonu olup olmadığı veya aterosklerotik dokuda GHS-R1a artışı olup olmadığı sorularını akla getirmektedir. McNay ve arkadaşları [30], intravenöz ghrelin uygulamasının kan basıncında düşüşe sebep olduğunu ve in vitro primer erişkin H9c2 kardiyomiyositlerinde, endotelial hücrelerde ghrelinin apoptozisi inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Büyüme Hormonu Salımı

Ghrelinin endokrin sistemdeki primer etkisi büyüme hormonu salımını sağlamaktır. G-protein bağlı GHS-R reseptörüne bağlandığında IP3 aracılığıyla hücre içi Ca^{2+} yı arttırarak büyüme hormonu salımını stimüle etmektedir. Ghrelinin büyüme hormonu üzerindeki etkisinin doz bağımlı olduğu in vitro ve in vivo deneylerle gösterilmiştir. İntravenöz ghrelin uygulamasının hem sıçanlarda hem de

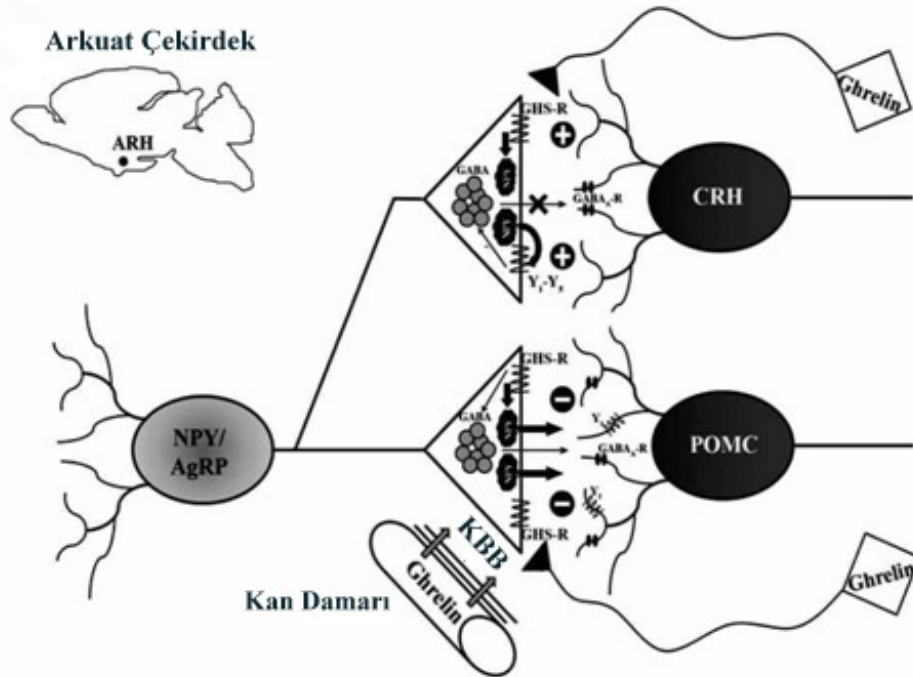
insanlarda yoğun miktarda büyüme hormonu salımına sebep olduğu tespit edilmiştir [88].

İnsülin Sekresyonu

Ghrelinin insülin sekresyonuna etkisinin ne yönde olduğu halen tartışılmaktadır. İnsülin sekresyonunu stimüle ettiğini veya inhibe ettiğini söyleyen gruplar mevcuttur. Deney sonuçlarının farklı çıkmasında çalışma koşullarının ve kullanılan deneklerin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Kan glukoz düzeyinin, ghrelinin insülin sekresyonu üzerine etkisini belirleyen faktörlerden biri olduğu öne sürülmüştür. Adeghate ve arkadaşları [89] kan glukoz düzeyi 2.8 mM iken ghrelinin insülin sekresyonunu etkilemediğini fakat, kan glukoz seviyesi 8.3 mM olduğunda ghrelinin insülin sekresyonunu stimüle ettiğini göstermişlerdir.

İştah Regülasyonu

İştah regülasyonunda görev alan hipotalamik arkuat çekirdekte ghrelin içeren nöronlar bulunduğu immünohistokimyasal tekniklerle belirlenmiş ve ghrelinin oreksijenik etki mekanizması Şekil 2.12'de gösterilmiştir. Arkuat çekirdekteki ghrelin içeren nöronlar, Nöropeptid Y (NPY) ve Agouti Related Peptid (AgRP) nöronlarına efferent lifler göndererek oreksijenik peptid salınımını stimüle etmekte, Proopiomelanokortin (POMC) nöronlarına efferent lif göndererek de anoreksijenik peptid salınımını suprese etmektedir. Ayrıca, paraventriküler nükleusta bulunan ghrelin nöronları NPY nöronlarına efferent lifler göndererek GABA salımını baskılamakta ve kortikotropin salıcı hormonu (CRH) eksprese eden nöronları stimüle ederek adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizol salınımına yol açmaktadır [88].



Şekil 2.12. Ghrelinin oreksijenik etki mekanizması

Kognisyon

Carlini ve arkadaşları [90] ghrelinin hipokampusun yanı sıra diğer beyin bölgelerindeki kognitif işlemleri modüle ettiğini göstermiştir. Yaptıkları çalışmada hipokampus, amigdala ve dorsal rafeye ghrelin uygulandığında “sakınma görevi (avoidance task)” testi ile hafızanın geliştiğini tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada da amigdalaya ghrelin uygulandığında “elevated plus maze” testinde anksiyetenin arttığı gözlenmiştir [90, 91]. Hipokampusa uygulanan ghrelinin gıda alımını arttırması, ghrelinin limbik sistem içindeki etkileri ile hipotalamik işlemler arasında bağlantı olabileceği fikrini doğurmuştur. Diano ve arkadaşları [92] sistemik ve intraserebroventriküler ghrelin uygulamasının hipokampal fizyoloji üzerindeki etkisini sıçanları uzaysal hafıza ve “novel object recognition” testlerine tabi tutarak incelediklerinde her iki uygulamada da ghrelinin hafızayı geliştirdiğini ve hipokampusta LTP oluşumunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Daha sonra yaptıkları bir diğer çalışmada da ghrelin-knockout farelerin yeni objeleri tanıma (novel object recognition) hafızasında ciddi bozulma olduğunu göstermişlerdir. Ghrelin hipotalamusta, mezensefalonda ve hipokampusta sinaptik yoğunluğu arttırmaktadır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada 4 gün boyunca günde 2 kere intraperitoneal ghrelin uygulamasının hipokampal CA1 bölgesindeki spin yoğunluğunu kontrole göre arttırdığı, ghrelin-knockout farelerde ise spin yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

Öğrenme ve hafızanın temel mekanizması olan LTP’de NO’nun rolü göz önünde bulundurulduğunda, ghrelinin kognitif etkilerini NO üzerinden yapabileceği düşünülmektedir. Carlini ve arkadaşlarının [93] yaptığı çalışmada intrahipokampal ghrelin uygulamasının NO seviyelerini NOS aktivitesini etkileyerek arttırdığı, hipokampal dentat girusta LTP eşliğini düşürdüğü ve inhibitör sakınma testinde öğrenmeyi geliştirdiği tespit edilmiştir.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinde gerçekleştirilen bu çalışmada 3 aylık, ortalama 250 - 300 g ağırlığında erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma ve Deneysel Protokolü

Deneysel Hayvanlar Ünitesinden birer ay ara ile rastgele alınan toplam 80 adet sıçan her grupta 20 hayvan olacak şekilde dört gruba bölünmüştür.

Grup 1: Sham grubu (SHAM)

Grup 2: Ghrelin grubu (GHR)

Grup 3: İskemi Reperfüzyon grubu (İ/R)

Grup 4: İskemi Reperfüzyon + Ghrelin grubu (İ/R + GHR)

Deneysel protokolü:

Deneysel süresi boyunca, hayvanlar her kafeste 4 hayvan olacak şekilde, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulmuşlardır. Bu süre içinde hayvanlar, ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir.

Deneysel süresince;

i) SHAM grubuna ameliyat yapılmış ve ameliyat sonrası 3 gün boyunca 0.3 ml/sıçan/gün serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

ii) GHR grubuna ameliyat yapılmış ve ameliyat sonrası 3 gün boyunca 80µg/kg/gün dozda ghrelin (GenScript) intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

iii) İ/R grubunda dört damar oklüzyonu metoduyla 8 dakika süresince global serebral iskemi oluşturulmuştur. Reperfüzyon süresi olarak belirlenen 3 gün boyunca 0.3ml/sıçan/gün serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

iv) İ/R + GHR grubunda dört damar oklüzyonu metoduyla 8 dakika süresince global serebral iskemi oluşturulmuştur. Reperfüzyon süresi olarak belirlenen 3 gün boyunca 80µg/kg/gün dozda ghrelin (GenScript) intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlerde yapılan öğrenme deneylerini takiben, ürethan anestezisi altında sıçanların abdominal aortalarından kan alındıktan sonra, sol ventrikülden girilip aortaya kanül yerleştirilmiş, kanülün distalinden oklüzyon yapılarak heparinli serum fizyolojik ile beyin perfüzyonu sağlanmıştır. Perfüzyonu takiben beyin dokuları çıkarılmış ve histolojik parametrelerin tayininde kullanılacak

olanlar paraformaldehit içine bırakılmış, biyokimyasal parametrelerde kullanılacak olanlar ise hipokampusları ayrılarak ependorf tüplere konulmuş ve -80°C 'de saklanmıştır.

Deneysel Global Serebral İskemi Modeli

Geçici global serebral iske mi dört damar oklüzyonu (4-VO) metodu kullanılarak oluşturulmuştur [95]. Kısaca, ketamin ksilazin (100:8 mg/kg) anestezisi altında sıçanlara 2,5 cm dorsal servikal orta hat insizyonu yapı lıp birinci servikal vertebra ekspoz e edildikten sonra alar foraminadan elektrokoterizasyon ile vertebral arterler kalıcı bir biçimde koagüle edilmiştir. Vertebral arterlerin elektrokoagülasyonunun ardından 2,5 cm ventral servikal orta hat insizyonu yapı lmış ve ortak karotid arterler nervus vagus intakt kalacak biçimde izole edilmiştir. İzole edilen arterler 3-0 ipek ile askıya alındıktan sonra mikroanevrizma klempleri kullanılarak 8 dakika boyunca oklüde edilmiş ve global serebral iske mi oluşturulmuştur. Global serebral iske mi, EEG monitorizasyonu ile takip edilmiştir. Klemplerin yerleştirilmesini takip eden ilk dakika içerisinde izoelektrik EEG sinyali elde edilen sıçanlar deneye alınmıştır. Klemplerin çıkarılmasıyla 72 saatlik reperfüzyon süreci başlatılmıştır.

3.2.Öğrenme Parametrelerin Tayini

Projemizde, öğrenme parametreleri için Y labirenti testi ve açık alan (open field) testi kullanılmıştır.

3.2.1.Y-Labirent Testi

Y-Labirent düzeneği, her bir kolu 40 cm uzunluğunda, 20 cm duvar yüksekliğinde ve 10 cm genişliğinde olan üç kollu siyah bir labirenttir. Çalışmamızda Y labirentin kolları 'başlangıç', 'diğer' ve 'yeni' kol olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.1 Y labirenti

Deneyin ilk kısmında sıçanlar başlangıç kolunun ucuna bırakılmışlardır. Her bir sıçana yeni kol tamamen kapalı iken, diğer kolları serbestçe inceleyebilmeleri için 15 dakika zaman verilmiştir. 15 dakikanın sonunda sıçanlar kafeslere geri alınmış ve deney sırasında koku duyusuna göre hareketlerini engellemek için Y-

labirent düzeneği %70 etanol ile temizlenmiştir. Dört saat sonra kapalı olan yeni kol açılarak sıçanlar daha önce bırakıldıkları noktadan Y-labirent düzeneğinin içine bırakılmış ve 5 dakika süreyle davranışları video ile kaydedilmiştir. Her bir kola giriş sayıları, her kolda geçirdikleri toplam süre, kat ettikleri toplam yol ve ortalama hızları video takip sistemi kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2. Açık Alan Testi

Açık alan deneyleri duvar yüksekliği 40 cm, tabanı 80X80 cm² ebatlarında kare şeklinde mat siyah boyalı düzende yapılmıştır. Alan, birbirine eş 16 küçük kareye bölünmüştür. Deneyin başlangıcında deney hayvanı bu alanın merkezine bırakılmış ve 3 dakika boyunca hareketleri dijital olarak kaydedilmiştir. Sıçanın girdiği kare sayısı, katettiği toplam mesafe ve ortalama hızı ölçülmüştür.

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

3.3.1. Plazma Açile Ghrelin Tayini

Plazma açile ghrelin miktarının analizi dokuya uyumlu EIA kiti kullanılarak yapılmıştır.

Reaktifler ve Kimyasallar:

- 1) Sıçan Açile Ghrelin Enzim İmmüno Analiz Kiti (Rat Acylated Ghrelin Enzyme Immunoassay Kit , Cayman)
- 2) Etilenediaminetetra-asetik asit (EDTA)
- 3) Potasyum fosfat tamponu (0,1M, pH 7.4)
- 4) Sodyum Hidroksit (NaOH 10N)
- 5) p-Hidroksimerküribenzoik asit (PHMB)
- 6) Hidroklorik Asit (HCl 1N)

İşlemler:

Kanlar, PHMB eklenmiş EDTA'lı tüplere alındıktan sonra +4°C'de, 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Alınan süpernatanlara hızlı bir şekilde 1ml plazma başına 100 µl oranında 1N HCl eklendikten sonra +4°C'de, 3500 rpm'de, 5 dk boyunca ikinci santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatanlar – 80°C'de saklanmıştır. EIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında plazmadaki açile ghrelin miktarı pg/ml plazma olarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Plazma Deaçile Ghrelin Tayini

Plazma deaçile ghrelin miktarının analizi dokuya uyumlu EIA kiti kullanılarak yapılmıştır.

Reaktifler ve Kimyasallar:

- 1) Sıçan Deaçile Ghrelin Enzim İmmüno Analiz Kiti (Rat Unacylated Ghrelin Enzyme Immunoassay Kit , Cayman)
- 2) Etilendiaminetetra-asetik asit (EDTA)
- 3) Potasyum fosfat tamponu (0,1M, pH 7.4)

İşlemler:

Kanlar, EDTA'lı tüplere alındıktan sonra +4°C'de, 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar – 80°C'de saklanmıştır. EIA kiti ile yapılan ölçüm sonrasında plazmadaki deağıle ghrelin miktarı pg/ml plazma olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. Total Antioksidan Kapasite Tayini (TAK)

Total antioksidan kapasite, kit kullanılarak kolorimetrik metod ile ölçülmüştür [96].

Reaktifler ve Kimyasallar:

1. Total Antioksidan Kapasite Kiti (Total Antioksidant Status Assay Kit, Relassay)
2. 140mM KCl Tamponu

İşlemler:

Total antioksidan kapasite tayini için hipokampus dokuları 10 mg doku başına 90 µl tampon eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemini takiben +4°C'de, 3000 rpm'de, 5 dk santrifüj yapıp süpernatantlar alınmıştır. Santrifüj işlemlerinin ardından elde edilen süpernatantlar – 20°C'de saklanmıştır. Kit ile yapılan ölçüm sonrasında örnekteki total antioksidan kapasite µM H₂O₂ Eq./L olarak hesaplanmıştır. Daha sonra protein değerlerine bölünerek sonuçlar µM/g protein olarak verilmiştir.

3.3.4. Total Oksidan Kapasite Tayini (TOK)

Total oksidan kapasite, kit kullanılarak kolorimetrik metod ile ölçülmüştür [97].

Reaktifler ve Kimyasallar:

1. Total Oksidan Kapasite Kiti (Total Oksidant Status Assay Kit, Relassay)
2. 140mM KCl Tamponu

İşlemler:

Total oksidan kapasite tayini için hipokampus dokuları 10 mg doku başına 90 µl tampon eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemini takiben +4 °C'de, 3000 rpm'de, 5 dk santrifüj yapıp süpernatantlar alınmıştır. Santrifüj işlemlerinin ardından elde edilen süpernatantlar – 20 °C'de saklanmıştır. Kit ile yapılan ölçüm sonrasında örnekteki total oksidan kapasite µM H₂O₂ Equiv./L olarak hesaplanmıştır. Daha sonra protein değerlerine bölünerek sonuçlar µM/g protein olarak verilmiştir.

3.3.5. Nitrit/Nitrat Tayini

Nitrit/Nitrat miktarının analizi dokuya uyumlu kolorimetrik kit kullanılarak yapılmıştır [98].

Reaktifler ve Kimyasallar:

1. Nitrit/Nitrate Kolorimetrik Analiz Kiti (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman)
2. 1X PBS, pH 7.4

İşlemler:

Nitrit/Nitrat miktarı tayini için hipokampus dokuları 10 mg doku başına 200 µl PBS eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemini takiben +4 °C’de, 10000 g’de, 20 dk santrifüj yapıp süpernatantlar alınmıştır. Alınan süpernatantlar +4 °C’de 100000 g’de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar 30kD’luk filtre içeren ependorf tüplere aktarılıp 15000 g’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemlerinin ardından elde edilen süpernatantlar – 20°C’de saklanmıştır. Kolorimetrik kit ile yapılan ölçüm sonrasında örnekteki Nitrit/Nitrat düzeyi µM olarak hesaplanmıştır. Daha sonra protein değerlerine bölünerek sonuçlar µM/g protein olarak verilmiştir.

3.3.6. Protein Tayini

Hipokampus dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir kit ile yapılmıştır[99].

Reaktifler:

- 1) Standart solüsyon: 2 µg/ µl bovin serum albümin (Albümin Bovina, Sigma, A-8022)
- 2) CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210)

İşlemler: 1 µl doku süpernatantı 499 µl ve 49 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:500 ve 1:50) sonra üzerlerine sırasıyla 500 µl ve 50 µl CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm’de absorbanslar spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

Protein Miktarının Hesaplanması: Dokulardaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4. n-NOS ve iNOS Düzeylerinin İmmunohistokimyasal Tayini

Beyin dokusundan alınan 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitler, Poly-L-Lizin kaplı lamalar üzerine alınarak bir gece 56°C’lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinasyon için iki kere onar dakika ksilol I ve ksilol II’den geçirilen kesitler her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve %70’lik azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmişlerdir. Daha sonra, distile suda çalkalanmış ve fosfat tuzu tamponunda (PBS, Ph: 7.2 -7.4) üç kez beşer dakika yıkanmışlardır. Kesitler, antijenik maskenin giderilmesi için 200 ml sitrat tamponuna (pH:6.0)

konularak mikrodalga fırında iki kere beşer dakika muamele edilmiş, daha sonra fırın dışında yirmi dakika soğumaya bırakılmışlardır. Bunu takiben çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile sudan ve PBS 'ten geçirildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için % 3'lük hidrojen peroksit ile yarım saat oda ısısında inkübe edilmişlerdir. Distile suda çalkalanıp PBS 'te yıkanan kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan immünoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile yedi dakika muamele edilmiş ve serumun fazlası alınarak kesitler, tavşan poliklonal anti-nNOS ve anti-iNOS antikolarıyla bir saat süreyle oda ısısında nemli ortamda inkübe edilmişlerdir. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine normal tavşan immünoglobulinleri uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanan kesitler oda sıcaklığında bir buçuk saat biyotinli sekonder antikor ve streptavidin – peroksidaz kompleksi ile inkübe edilmişlerdir. Tekrar PBS ile üç kez beşer dakika yıkama uygulandıktan sonra sinyali geliştirmek için dokular 3' Diamino benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edilmiş ve musluk suyunda yıkanmışlardır. Kesitler, Mayer'in hematoksilen'inde onbeş saniye zıt boyama yapıldıktan sonra tekrar artan alkol serilerinde dehidrate edilip ksilole alınmış ve ardından kapatma solüsyonu ile kapatılmışlardır. Bütün gruplar aynı gün içerisinde aynı muamelelerden geçirilerek boyanmışlardır. Boyanmış kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiş ve fotoğraflandırılmıştır.

3.5. Hematoksilen Eozin Boyama

Beyin dokusundan alınan 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitler, Poly-L-Lizin kaplı lamalar üzerine alınarak bir gece 56°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinasyon için iki kere onar dakika ksilol I ve ksilol II'den geçirilen kesitler her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmişlerdir. Rehidratasyon işlemini takiben kesitler bir dk boyunca hematoksilen solüsyonunda tutulmuştur. Hematoksilen solüsyonundan çıkarılan kesitler PBS'de beş dakika yıkandıktan sonra diferansiyasyon işlemi için asit-alkol solüsyonuna 1-3 s batırılıp çıkarılmıştır. Beş dakikalık PBS yıkamasının ardından kesitler iki dakika boyunca eozin boya solüsyonunda bekletilmiştir. Solüsyondan çıkarılan kesitler, beş dakika süresince PBS ile yıkandıktan sonra bir dakika %80, bir dakika %95 alkolde ve 1 saat ksilende tutulmuştur. Son olarak ksilenden çıkarılan kesitlerin üzerine entellan damlatılarak kapatma işlemi tamamlanmış ve kesitler ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis Varyans Analizi, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U Testi kullanılarak yapılmıştır. $P < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Deney süresince sham opere edilen sıçanlarda postür bozukluğuna rastlanmaz iken, İ/R uygulanan sıçanların hareketliliğinde ve yem tüketiminde azalma gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, davranış deneyleri esnasında İ/R uygulanan sıçanlar sham opere edilen sıçanlardan çok daha az anksiyete göstermiştir.

4.2. Y- labirent Testi Sonuçları

Y-labirent testinde sıçanların yeni kola giriş frekansları incelendiğinde ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlerde SHAM ve GHR grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. İskemi/reperfüzyon grubu frekans değerlerinin hem 24. hem de 48. saatte gruba göre belirgin biçimde azaldığı saptanmıştır. İ/R+GHR grubunun 24 saatlik frekansının SHAM grubuna göre azaldığı, I/R grubuna göre arttığı tespit edilmiş, 48.saat değerlerinin ise diğer gruplardan farklı olmadığı bulunmuştur. Tüm grupların ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlere ait yeni kola giriş frekansları Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

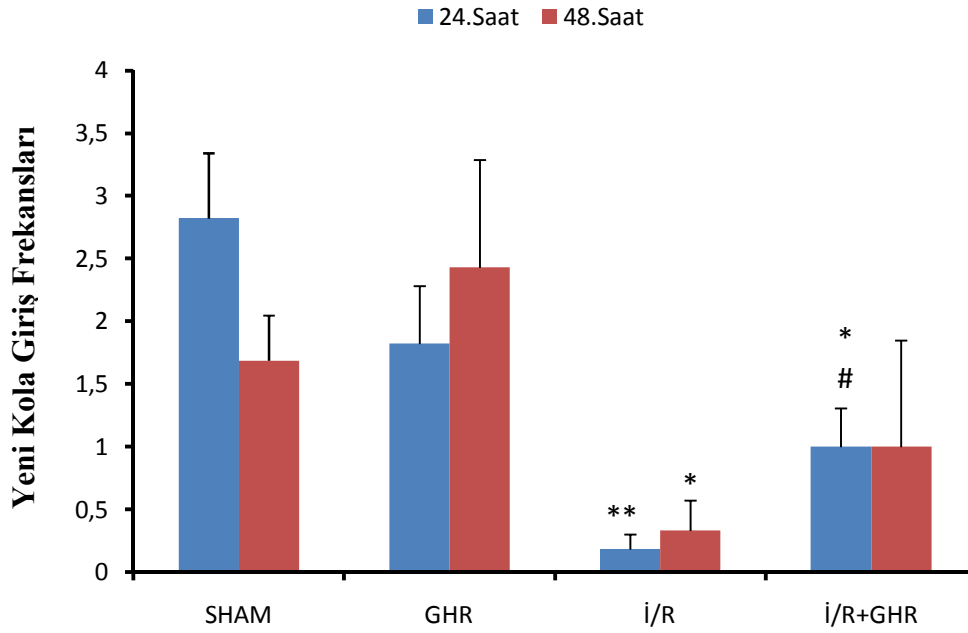
Y-labirent testinde sıçanların yeni kolda geçirdikleri süre incelendiğinde, ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlerde SHAM ve GHR grupları arasında anlamlı bir fark görülmezken, 24. saatte İ/R grubu değerlerinin SHAM gruba göre azaldığı, İ/R+GHR grubu değerlerinin ise tüm gruplara göre arttığı görülmüştür. 48.saatte ise İ/R ve İ/R+GHR grupları arasında anlamlı fark bulunmamış, her iki grubun yeni kolda geçirdikleri süre hem SHAM hem de GHR grubuna göre azalmıştır. Tüm grupların ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlere ait yeni kolda geçirilen süre değerleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Y-labirent testinde sıçanların aldığı toplam yol incelendiğinde, ameliyat sonrası 24. saatte SHAM ve GHR grupları, I/R ve I/R+GHR grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamış, I/R ve I/R+GHR gruplarının yol değerleri SHAM ve GHR gruplarına göre azalmıştır. Ameliyat sonrası 48. saatte tüm grup değerleri SHAM grubuna göre azalmıştır. Tüm grupların ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlere ait y-labirent testinde aldıkları toplam yol değerleri Tablo 4.3’te ve Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların yeni kola giriş frekansları.

GRUPLAR	YENİ KOLA GİRİŞ FREKANSLARI	
	24.saat	48.saat
SHAM (n=15)	2,82 ± 0,52	1,69 ± 0,36
GHR (n=14)	1,82 ± 0,46	2,43 ± 0,86
İ/R (n=9)	0,18 ± 0,12 **	0,33 ± 0,24 *
İ/R GHR (n=8)	1,00 ± 0,31 * #	1,0 ± 0,85

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



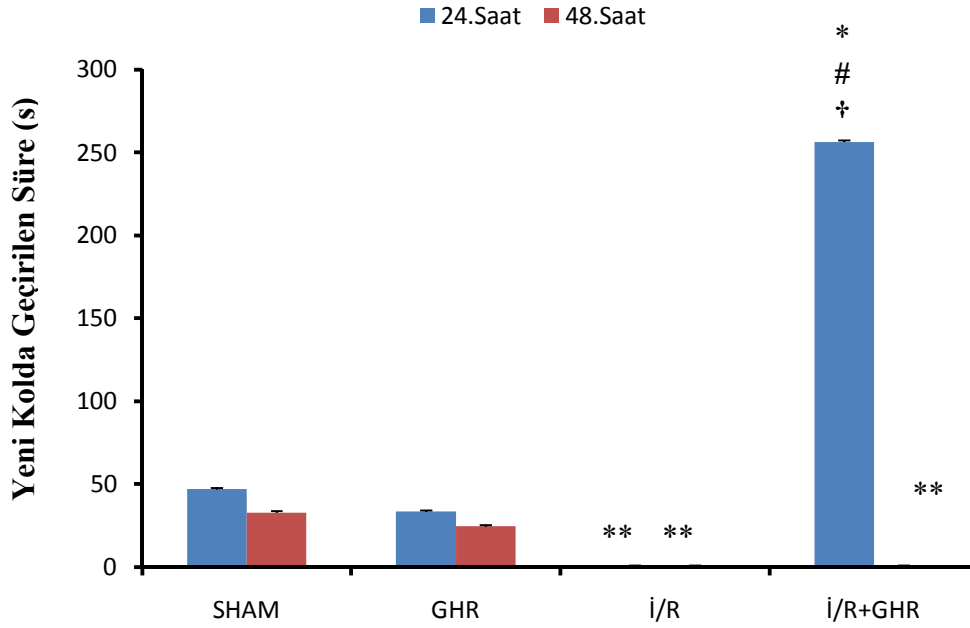
Şekil 4.1. Yeni Kola Giriş Frekansları

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Grupların yeni kolda geçirdiği süre.

GRUPLAR	YENİ KOLDA GEÇİRİLEN SÜRE (s)	
	24.saat	48.saat
SHAM (n=15)	46,91 ± 7,66	32,80 ± 4,20
GHR (n=14)	33,48 ± 4,20	24,61 ± 5,64
İ/R (n=9)	0,00 **	0,00 **
İ/R GHR (n=8)	256,40 ± 34,56 *, #, †	0,00 **, †

* p<0.01 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre, † p<0.01 GHR grubuna göre, # p<0.01 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



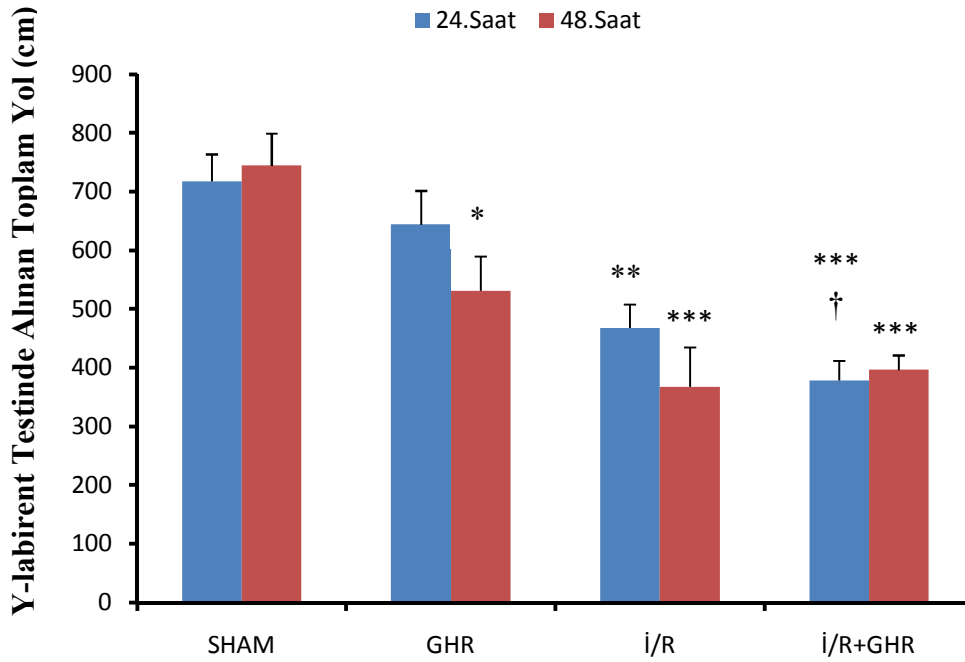
Şekil 4.2. Yeni Kolda Geçirilen Süre

* p<0.01 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre, † p<0.01 GHR grubuna göre, # p<0.01 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların Y-labirent testinde aldıkları toplam yol.

GRUPLAR	ALINAN TOPLAM YOL (cm)	
	24.Saat	48.Saat
SHAM (n=15)	717,59 ± 46,17	744,23 ± 55,02
GHR (n=14)	643,80 ± 57,75	531,09 ± 58,75 *
İ/R (n=9)	467,62 ± 39,88 **	367,34 ± 67,83 ***
İ/R GHR (n=8)	378,06 ± 33,62 ***, †	396,32 ± 24,78 ***

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.01 Sham gruba göre, *** p<0.001 Sham gruba göre, † p<0.01GHR grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. Y-labirent testinde alınan toplam yol

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.01 Sham gruba göre, *** p<0.001 Sham gruba göre, † p<0.01GHR grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

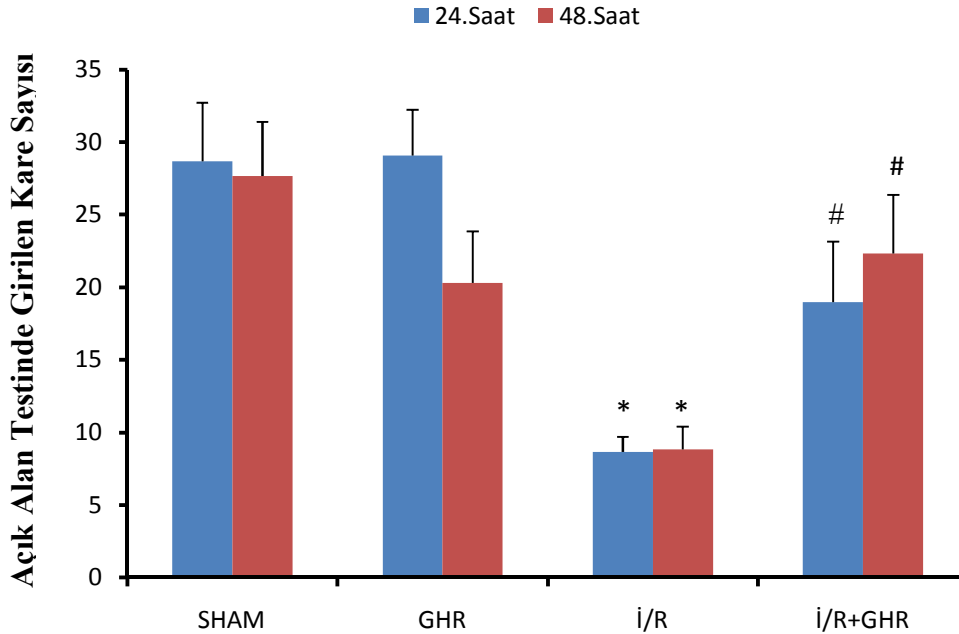
4.3. Açık Alan Testi Sonuçları

Açık alan testinde sıçanların girdikleri kare sayıları incelendiğinde ameliyat sonrası 24. ve 48 saatlerde benzer sonuçlar bulunmuştur. SHAM ve GHR gruplarının değerlerinin birbirine göre değişmediği, I/R grubu değerlerinin SHAM grubuna göre çarpıcı biçimde azaldığı, I/R+GHR grubu değerlerinin ise I/R grubuna göre arttığı bulunmuştur. Tüm grupların ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlere ait açık alan testinde girdikleri kare sayısı Tablo 4.4'te ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Açık alan testinde girilen kare sayısı.

GRUPLAR	GİRİLEN KARE SAYISI	
	24.saat	48.saat
SHAM (n=15)	28,69 ± 4,01	27,67 ± 3,73
GHR (n=14)	29,07 ± 3,15	20,29 ± 3,57
İ/R (n=9)	8,67 ± 1,04 *	8,83 ± 1,56 *
İ/R GHR (n=8)	19,00 ± 4,16 #	22,33 ± 4,04 #

* p<0.001 Sham gruba göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 4.4. Açık Alan Testinde Girilen Kare Sayısı

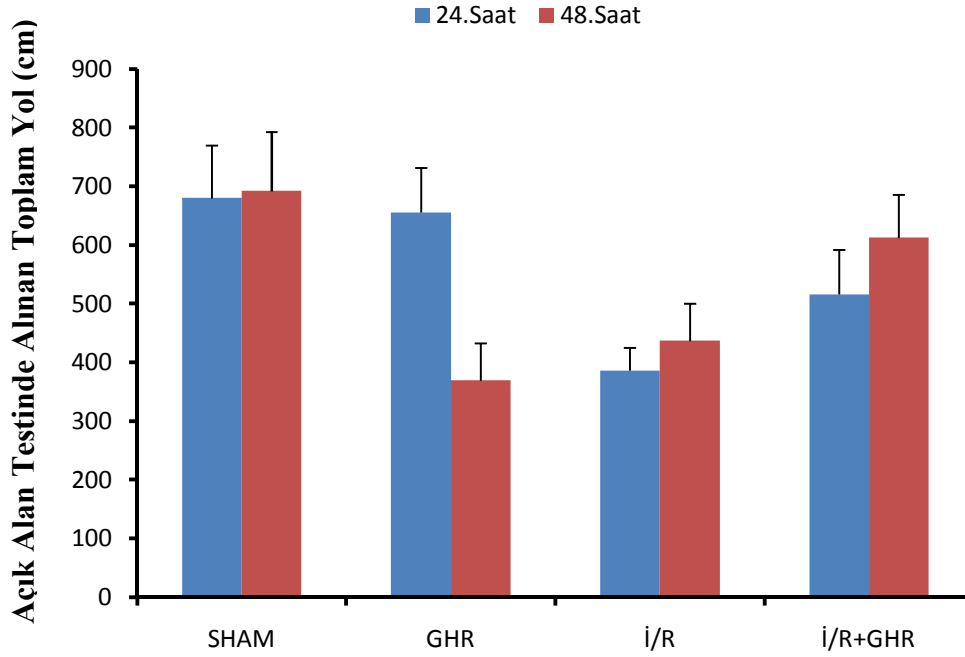
* p<0.001 Sham gruba göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Açık alan testinde sıçanların aldıkları toplam yol incelendiğinde ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tüm grupların ameliyat sonrası 24. ve 48. saatlere ait açık alan testinde aldıkları toplam yol değerleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Açık alan testinde alınan toplam yol.

GRUPLAR	ALINAN TOPLAM YOL (cm)	
	24.saat	48.saat
SHAM (n=15)	679,82 ± 90,20	691,79 ± 101,02
GHR (n=14)	655,17 ± 76,74	369,19 ± 63,24
İ/R (n=9)	386,24 ± 38,62	436,50 ± 63,29
İ/R GHR (n=8)	515,88 ± 75,62	612,10 ± 74,05

† p<0.05 GHR grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Açık Alan Testinde Alınan Toplam Yol
Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

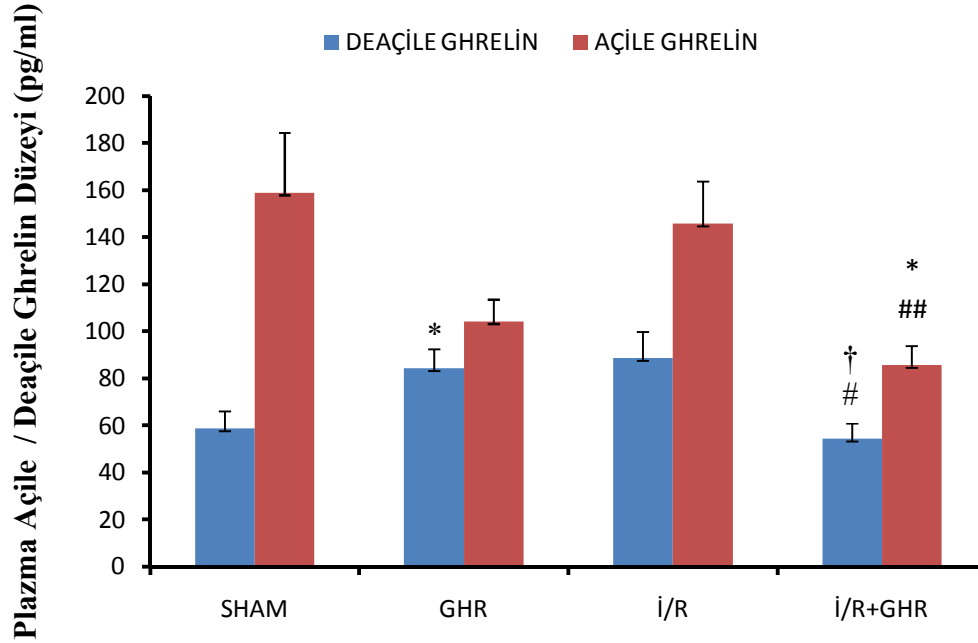
4.4. Plazma Açile ve Deaçile Ghrelin Sonuçları

Plazma açile ghrelin değerleri incelendiğinde GHR grubu değerlerinin SHAM gruba göre arttığı, İ/R+GHR grubu değerlerinin ise hem GHR hem de İ/R grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Plazma deaçile ghrelin değerlerine bakıldığında, SHAM, GHR ve İ/R grupları arasında fark görülmezken, İ/R+GHR grubu değerlerinin SHAM ve İ/R gruplarına göre azaldığı görülmüştür. Plazma açile ve deaçile ghrelin sonuçları Tablo 4.6 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Plazma açile ve deaçile ghrelin değerleri.

GRUPLAR	AÇİLE GHRELİN (pg/ml)	DEAÇİLE GHRELİN (pg/ml)
SHAM (n=15)	58,72 ± 7,35	158,92 ± 25,42
GHR (n=14)	84,34 ± 8,14 *	104,26 ± 9,33
İ/R (n=9)	88,55 ± 11,36	145,82 ± 17,91
İ/R GHR (n=8)	54,35 ± 6,76 †, #	85,65 ± 8,14 *, ##

*p<0.05 Sham gruba göre, † p<0.05 GHR grubuna göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre, ## p<0.01 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. Plazma Açile/Deaçile Ghrelin Değerleri

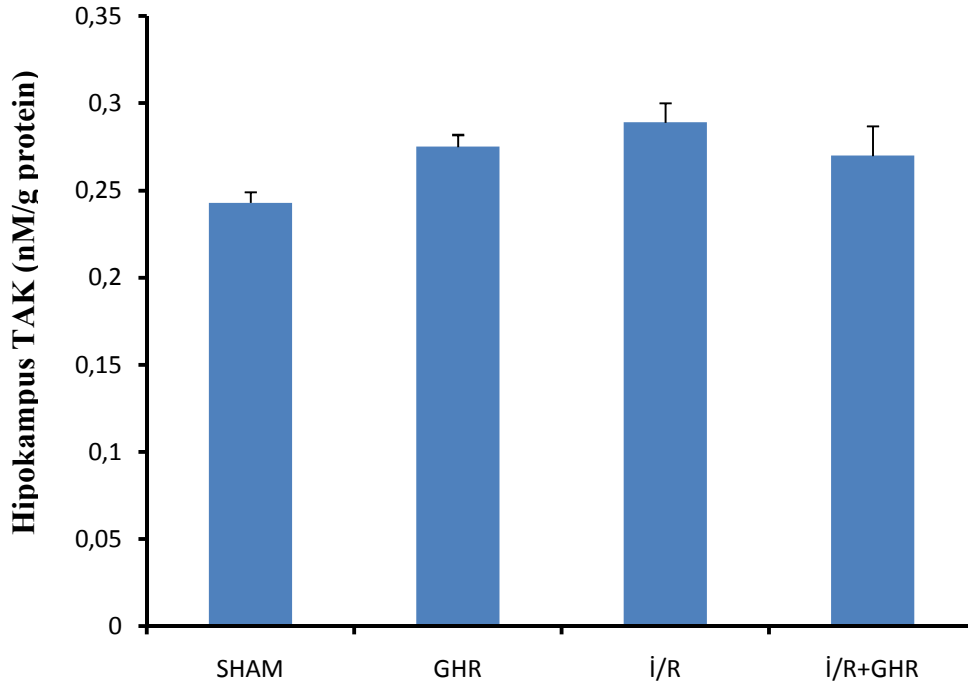
*p<0.05 Sham gruba göre, † p<0.05 GHR grubuna göre, # p<0.05 İ/R grubuna göre, ## p<0.01 İ/R grubuna göre fark. Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

4.5. Total Antioksidan Kapasite Sonuçları

Hipokampusta total antioksidan kapasiteleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tüm gruplara ait TAK değerleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Hipokampusta total antioksidan kapasite değerleri.

GRUPLAR	TAK (nM/ g protein)
SHAM (n=15)	0,25 ± 0,01
GHR (n=14)	0,28 ± 0,01
İ/R (n=9)	0,29 ± 0,01
İ/R GHR (n=8)	0,27 ± 0,02



Şekil 4.7. Hipokampus TAK sonuçları

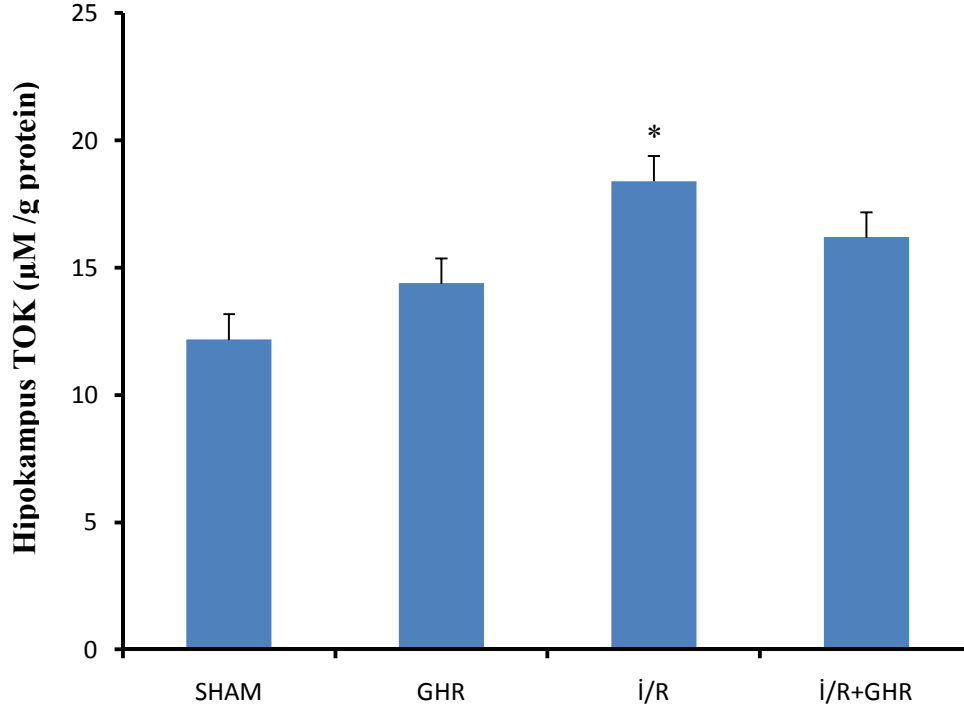
4.6. Total Oksidan Kapasite Sonuçları

Hipokampusta ölçülen total oksidan kapasite İ/R grubunda SHAM gruba göre belirgin biçimde artmış, İ/R+GHR grubuna göre değişmemiştir. SHAM, GHR ve İ/R+GHR gruplarının değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tüm gruplara ait TOK değerleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Hipokampusta total oksidan kapasite değerleri.

GRUPLAR	TOK ($\mu\text{M/g protein}$)
SHAM (n=15)	12,19 \pm 2,02
GHR (n=14)	14,40 \pm 3,71
İ/R (n=9)	18,41 \pm 3,03*
İ/R GHR (n=8)	16,20 \pm 4,83

* p<0.001 Sham gruba göre, † p<0.05 GHR grubuna göre fark. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 4.8. Hipokampus TOK değerleri

* p<0.001 Sham gruba göre fark. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

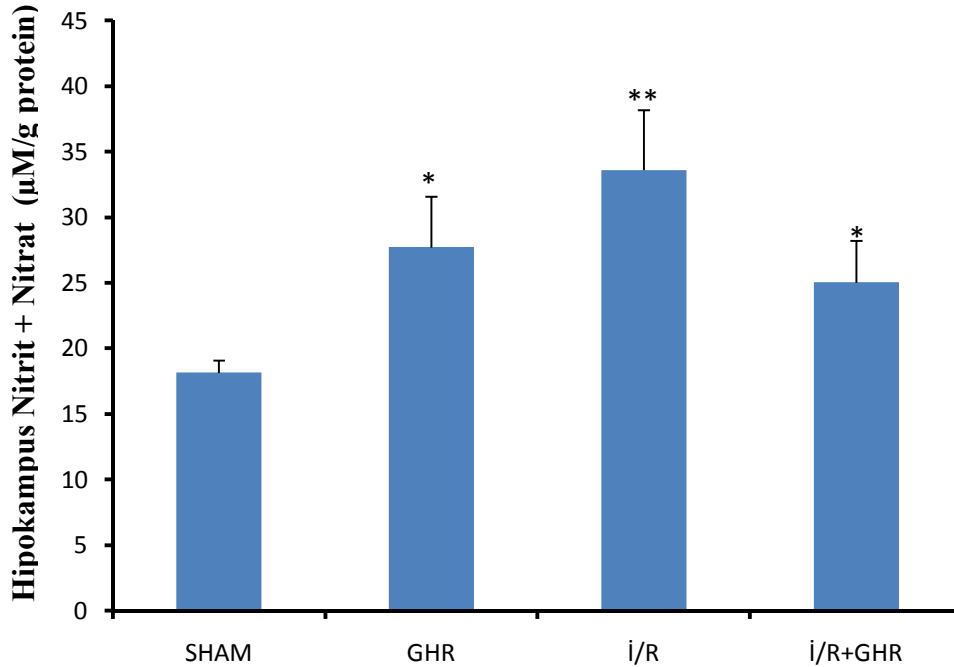
4.7. Nitrit/Nitrat Sonuçları

Hipokampusta ölçülen nitrit+nitrat seviyesi GHR, İ/R ve İR+GHR gruplarında SHAM gruba göre artmıştır. GHR, İ/R ve İR+GHR grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Tüm gruplara ait nitrit+nitrat değerleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Hipokampusta Nitrit + Nitrat değerleri.

GRUPLAR	NİTRİT + NİTRAT ($\mu\text{M/g protein}$)
SHAM (n=15)	18,17 \pm 0,92
GHR (n=14)	27,72 \pm 3,87 *
İ/R (n=9)	33,61 \pm 4,59 **
İ/R GHR (n=8)	25,05 \pm 3,16 *

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre fark. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.



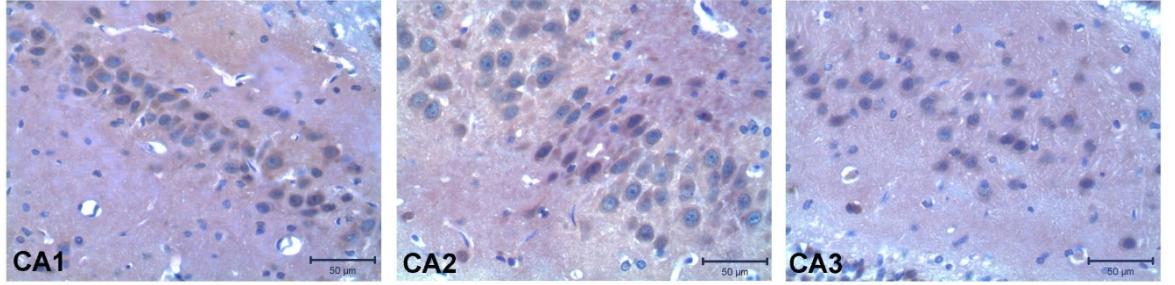
Şekil 4.9. Hipokampus Nitrit+Nitrat Değerleri

*p<0.05 Sham gruba göre, ** p<0.001 Sham gruba göre fark. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

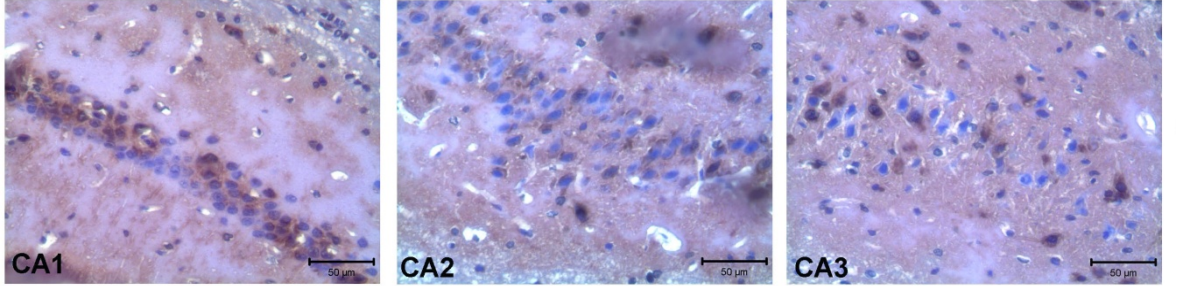
4.8. İmmünohistokimya Sonuçları

4.8.1. iNOS Sonuçları

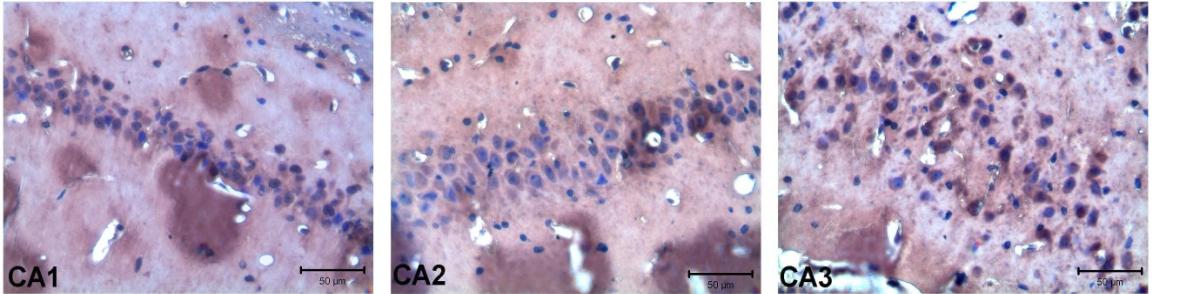
iNOS ekspresyonunun İ/R grubunda SHAM gruba göre ciddi biçimde arttığı, İ/R+GHR grubunda ise İ/R grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. SHAM grubuna ait görüntüler Şekil 4.10'da, GHR grubuna ait görüntüler Şekil 4.11'de, İ/R grubuna ait görüntüler Şekil 4.12'de, İR+GHR grubuna ait görüntüler Şekil 4.13'te verilmiştir.



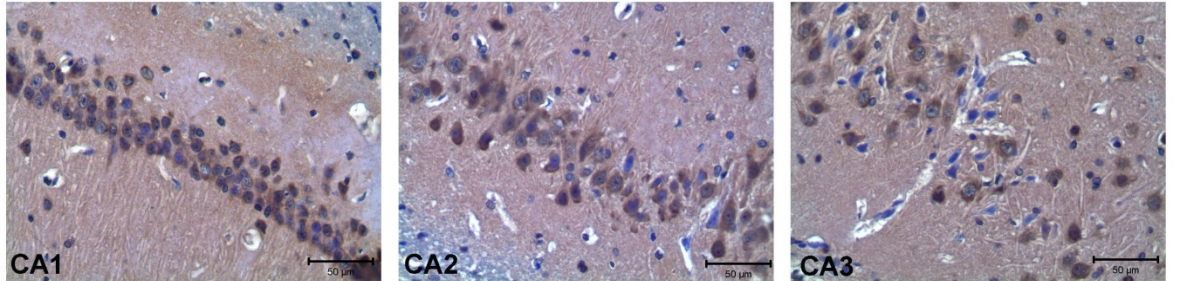
Şekil 4.10 Hipokampusta SHAM grup iNOS ekspresyonu



Şekil 4.11. Hipokampusta GHR grubu iNOS ekspresyonu



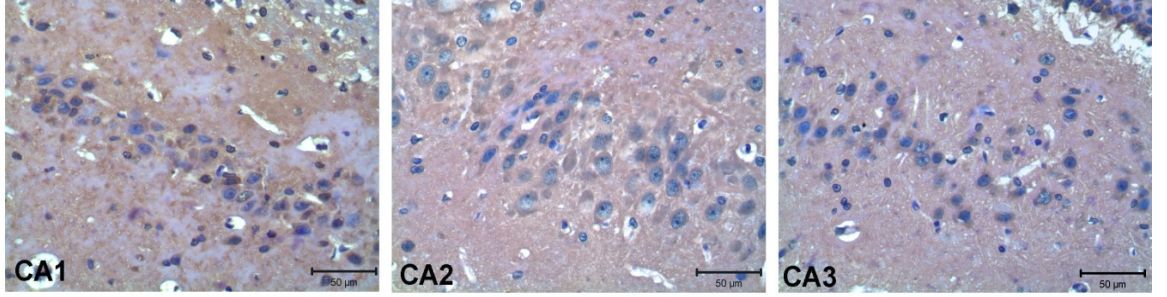
Şekil 4.12. Hipokampusta İ/R grubu iNOS ekspresyonu



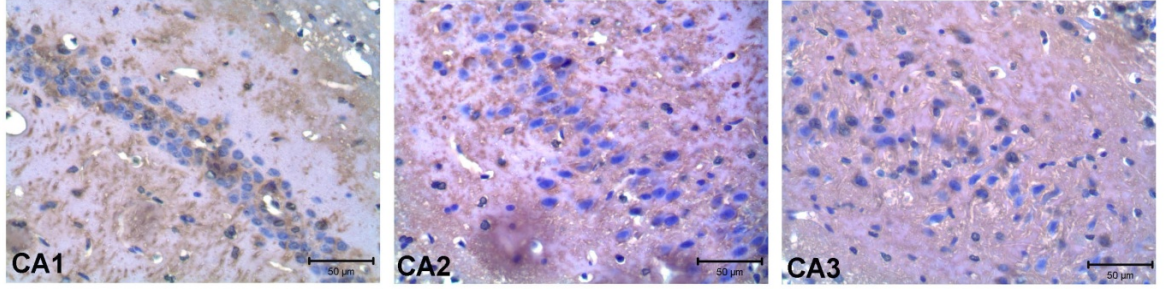
Şekil 4.13. Hipokampusta İ/R+GHR grubu iNOS ekspresyonu

4.8.2. nNOS Sonuçları

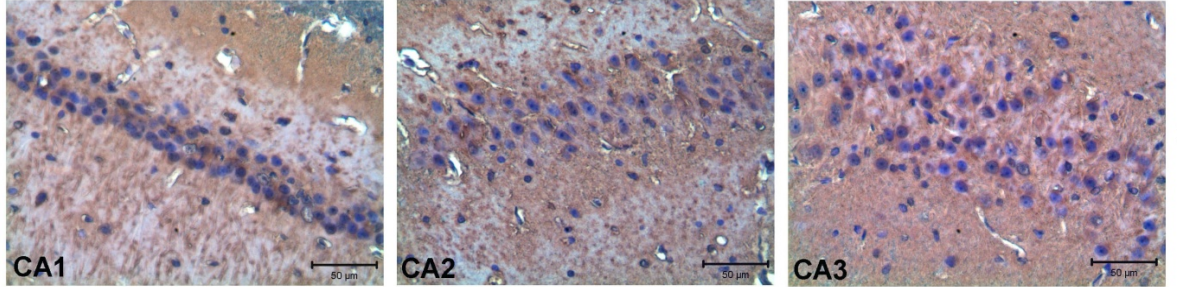
nNOS ekspresyonunun GHR, İ/R ve İ/R+GHR gruplarında SHAM gruba göre arttığı, en belirgin artışların İ/R, İ/R+GHR gruplarında olduğu gözlenmiştir. Gruplara ait nNOS fotoğrafları Şekil 4.14 (SHAM grup), Şekil 4.15 (GHR grubu), Şekil 4.16 (I/R grubu) ve Şekil 4.17'de (İ/R+GHR grubu) verilmiştir.



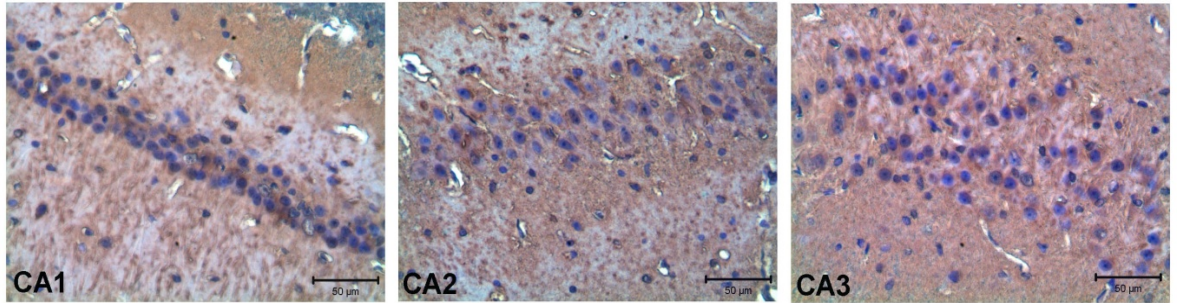
Şekil 4.14. Hipokampusta SHAM grup nNOS ekspresyonu



Şekil 4.15. Hipokampusta GHR grubu nNOS ekspresyonu



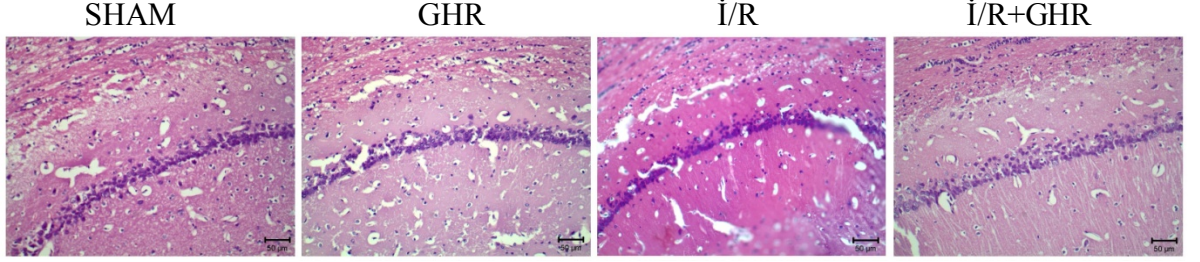
Şekil 4.16. Hipokampusta İ/R grubu nNOS ekspresyonu



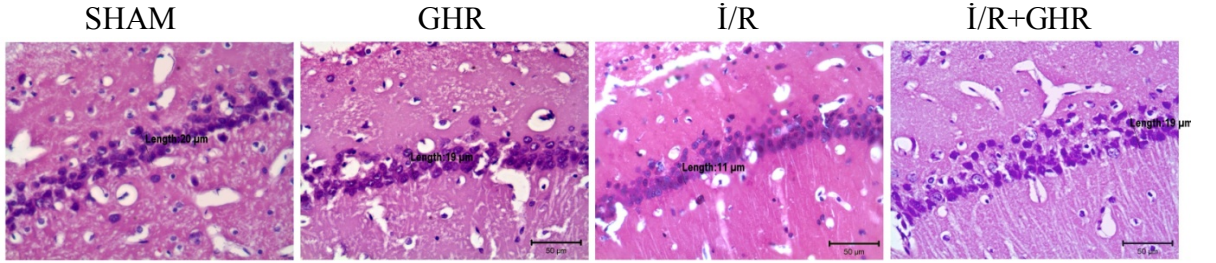
Şekil 4.17. Hipokampusta İ/R+GHR grubu nNOS ekspresyonu

4.9. Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları

Gruplara ait H&E boyama görüntüleri Şekil 4.18 ve 4.19’da gösterilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde İ/R grubunun hipokampal CA1 bölgesindeki piramidal tabaka kalınlığında (Tablo 4.10) ve yaşayan nöron sayısında diğer gruplara göre belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Hipokampal CA1 bölgesinde yaşayan nöron sayısı sonuçları Şekil 4.20’de verilmiştir.



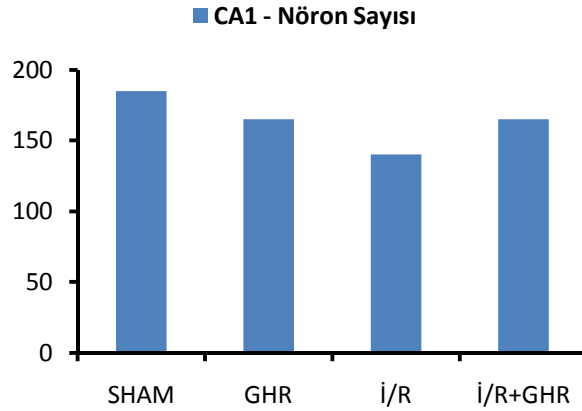
Şekil 4.18. Hipokampusta H&E boyama 20X



Şekil 4.19. Hipokampusta H&E boyama 40X

Tablo 4.10. Hipokampusta CA1 Piramidal Tabaka Kalınlığı

GRUP	CA1 Piramidal Tabaka Kalınlığı (µm)
SHAM	20
GHR	19
İ/R	11
İ/R+GHR	19



Şekil 4.20. CA1 Bölgesinde yaşayan nöron sayısı

TARTIŞMA

Serebral İ/R dünya genelinde üçüncü ölüm ve birinci morbidite sebebi olması nedeniyle, tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesi önemli bir amaç haline gelmiştir [100, 101]. Serebral İ/R'ye maruz kalmış kişilerde kalıcı motor disfonksiyonun yanısıra ağır kognitif hasar meydana gelmekte ve bu hastaların çok büyük bir kısmı özel kişisel bakım desteği almadan yaşamlarını idame ettirememektedirler [102].

İnsanlarda oluşan serebral İ/R'nin hasar mekanizmalarını aydınlatabilmek ve tedavi yaklaşımlarını geliştirmek amacıyla pek çok deneysel serebral iskemi modeli oluşturulmuştur. En çok uygulanan modeller fokal ve global serebral iskemidir ve uygulanan modelin seçimi araştırmanın amacına göre belirlenmektedir. Kemirgenlerde yapılan global serebral İ/R çalışmalarında en büyük hasarın hipokampusta olduğu ve bu hasarın iskeminin şiddetine, iskemi ve reperfüzyon sürelerine göre değiştiği pek çok kere gösterilmiştir [1, 55, 58, 59, 95]. Bu nedenle çalışmamızda serebral İ/R'nin özellikle öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmış ve bu doğrultuda global serebral İ/R modeli seçilerek dört damar oklüzyon metodu ile iskemi oluşturulmuştur [103]. Sıçanlarda yapılan global serebral İ/R çalışmalarında iskemi süreleri 5 ile 30 dakika arasında seçilmekte, reperfüzyon süreleri ise incelenecek parametrelere göre belirlenmektedir [104]. Oluşturduğumuz global serebral İ/R modelinde ölümcül olmayan şiddette iskemi oluşturmak amacıyla iskemi süresi 8 dakika, İ/R hasarının en şiddetli olduğu dönemi incelemek amacıyla da reperfüzyon süresi 72 saat olarak seçilmiştir [29, 105].

Geçici global serebral iskeminin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla klasik labirent testi, y-labirent testi, t-labirent testi, açık alan testi, Morris su tankı testi, rotarod testi gibi çeşitli davranış deneyleri yapılmakla beraber, hipokampal hasarın en çok bozukluk yarattığı hafıza türü olan uzaysal hafızayı değerlendirmek için y-labirent, t-labirent ve Morris su tankı testleri daha çok tercih edilmektedir [106-109]. Bizim çalışmamızda geçici global serebral İ/R'nin uzaysal hafıza üzerine etkilerini araştırmak için y-labirent testi, sıçanların araştırmacı davranış değişimlerini gözlemlemek için de açık alan testi kullanılmıştır. Çalışmamızda 8 dakikalık global serebral iskemiye takiben reperfüzyonun 24. ve 48. saatlerinde yapılan testlerle uzaysal hafızanın ve araştırmacı davranışın belirgin biçimde bozulduğu tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, Wang ve arkadaşları sıçanlarda yapmış oldukları 10 dakikalık global serebral iskemi sonrası 5. ve 9. reperfüzyon günlerinde uyguladıkları Morris su tankı ve açık alan testlerinde serebral İ/R'nin uzaysal hafıza ve araştırmacı davranış bozukluğuna sebep olduğunu gözlemlemişlerdir [110]. Diğer bir çalışmada ise global serebral iskemi uygulanan sıçanlarda reperfüzyonun 7.gününde Morris su tankı testinde uzaysal öğrenme ve hafızanın ciddi olarak bozulduğu saptanmıştır [111].

Projemizde tedavi edici ajan olarak sıçanlara verilen ghrelinin öğrenme ve hafızayı arttırdığı bilinmektedir. Nitekim erişkin sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada ghrelinin uzaysal hafızayı arttırdığı Morris su tankı testi ile gösterilmiş, ghrelin reseptör agonistlerinin verildiği diğer bir çalışmada ise öğrenme ve hafızadaki artış novel object recognition test ve Morris su tankı testleri ile tespit edilmiştir [112, 113]. Diano ve arkadaşlarının [92] fareler üzerinde yaptığı araştırmada ise, ghrelin kodlayan genin bloke edilmesi ile CA1 bölgesindeki spin yoğunluğunda azalma ve farelerin hafızalarında bozulma meydana geldiği, ghrelin uygulaması sonucunda bu etkilerin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında ghrelinin serebral İ/R kaynaklı öğrenme ve hafıza bozukluğu üzerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda İ/R'nin 24.saatinde öğrenme ve hafıza testlerinde ghrelin tedavisine bağlı olarak belirgin bir düzelmeye olduğu ancak, 48.saatte yapılan testlerde ghrelinin düzeltici etkisinin ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. 48.saatteki bu durumun sebebinin, İ/R hasarının, 24.saatte göre daha şiddetli hale gelmesi ve ghrelin dozunun yetersiz kalması ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Serebral İ/R hasarına bağlı öğrenme ve hafıza bozukluklarının nedenlerine yönelik pek çok araştırma yapılmış ve oksidatif stresin önemli bir etken olduğu vurgulanmıştır [114-116]. Nitekim Raz ve arkadaşları [103] sıçanlara 10 dakikalık global serebral iskemi uygulamış ve reperfüzyonun 7. gününde uzaysal hafızadaki bozulmaya hipokampal CA1 bölgesindeki süperoksit anyon miktarındaki artışın eşlik ettiğini göstermişlerdir. Yirmi dakika global serebral iskemi oluşturulan başka bir çalışmada da reperfüzyonun 7.gününde uzaysal hafızadaki bozulmayla birlikte lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeyindeki artış saptanmıştır [117]. Yaptığımız çalışmada global serebral İ/R'nin öğrenme ve hafıza üzerindeki olumsuz etkisinin oksidatif stres ile ilişkili olup olmadığını incelemek amacıyla TOK ölçtük. Ölçümlerimiz sonucunda TOK düzeyinin İ/R grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı biçimde arttığını saptadık. Total oksidan kapasitedeki artışın oksidatif stresin bir göstergesi olduğu göz önünde bulundurulduğunda, sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir [97].

Oksidatif stresin olduğu durumda oksidan hasar ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulduğu bilinmektedir [37]. Oksidan hasarın hem biyokimyasal hem de morfolojik olarak gösterildiği durumlarda antioksidan kapasitedeki değişimlerin nasıl olduğu araştırılmaktadır [118]. Bu nedenle antioksidan sistemin önemli bileşenleri olan SOD, CAT ve GPx düzeyleri incelenmektedir [119-121]. Serebral İ/R çalışmalarında da oksidatif stresin arttığı durumlarda antioksidan enzimlerin düzeyleri ve aktiviteleri incelenmiştir [122-126]. Nitekim, serebral iskemi geçirmiş hastalarda yapılan çalışmalarda eritrosit SOD ve serum EC-SOD aktivitelerinin değişmediği ancak BOS CuZn-SOD düzeyinin yükseldiği, total kanda CAT ve GPx aktivitelerinin belirgin olarak arttığı vurgulanmıştır [127-129]. Gerbillerde yapılan deneysel bir çalışmada ise 5 ve 10 dakika süreyle global serebral iskemi oluşturulmuş ve 1,2,4,7,14,28.reperfüzyon günlerinde hipokampusta total SOD düzeyinin değişmediği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada 15 dakikalık iskemiye takip eden 1. ve 2. reperfüzyon günlerinde ise SOD düzeyinde düşüş olduğu gösterilmiştir [104]. Farklı araştırma grupları tarafından 2

saatlik fokal serebral iskemi oluşturulan sıçanların reperfüzyonun değişik zamanlarında alınan beyin dokularında yapılan incelemelerde reperfüzyonun 22.saatinde GPx düzeyinin azaldığı, 24.saat, 48.saat ve 7.günde GPx, Mn-SOD, CuZn-SOD seviyelerinin değişmediği, 24.saatte CAT seviyesinde belirgin düşüş olduğu belirtilmiştir [122, 124, 130]. Çalışmamızda tek tek antioksidan enzim düzeylerinin ölçülmesi yerine tüm antioksidan ajanların varlığını gösteren TAK düzeyininin ölçmesi uygun görülmüştür. Yaptığımız istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız antioksidan enzim düzeylerinde değişme olmadığını vurgulayan yayınlarla paralellik göstermektedir. Bunun yanı sıra uyguladığımız 8 dakikalık iskemi süresinin TAK seviyelerinin değişmesi için yetersiz kalmış olabileceği kanısına varılmıştır.

Serebral İ/R'nin öğrenme ve hafıza üzerindeki olumsuz etkilerinde oksidan hasarın önemi bilindiğinden, çalışmalarda oksidatif stresi azaltmak amacıyla antioksidan ajan kullanımı yaygınlaşmıştır [131, 132]. Bu nedenle çalışmamızda kalp, karaciğer ve pankreasta oksidan hasarı azalttığı öne sürülen ve öğrenme üzerine olumlu etkileri olduğu bilinen ghrelin tedavi edici ajan olarak kullanılmıştır [112, 133-137]. El eter ve arkadaşları iskemiden 15 dakika önce ve reperfüzyon başlangıcında intravenöz olarak verdikleri 200ng/kg ghrelinin gastrik İ/R hasarını antioksidan etki göstererek azalttığını rapor etmişlerdir [24]. Yapılan diğer bir çalışmada ise sıçan kalbinde oluşturulan ex vivo İ/R hasarının 10^4 pM ghrelin uygulaması ile hafiflediği, enfarkt hacminin de azaldığı ortaya konmuştur [138]. İskemi reperfüzyon çalışmalarında oksidan hasara bağlı olarak apoptotik yolağın aktive olduğu antioksidan ajan kullanımı ile apoptozisin engellendiği bir çok parametre ile gösterilmiştir. Nitekim, global serebral iskemi oluşturulan sıçanlarda 80µg/kg ghrelin antioksidan ajan olarak iskemi öncesi ve reperfüzyon başlangıcında intraperitoneal yolla uygulanmış ve ghrelin uygulaması sonrasında enfarkt hacminin azaldığı, sitokrom c salınımının ve kaspaz-3 aktivitesinin inhibe edildiği sonuçta apoptozisin önlediği ve nöroprotektif etkinin ortaya çıktığı rapor edilmiştir [29, 139]. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda ameliyat sonrası 0, 24 ve 48.saatte 80µg/kg ghrelin intraperitoneal olarak uygulanmış ve İ/R oluşturulan gruba ghrelin verildiğinde TOK'nin azaldığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu azalma göz önünde bulundurulduğunda sonucumuzun literatüre paralel olduğu, ancak etkinin beklenen düzeyde olmayışının ghrelinin dozuna veya İ/R'nin süresine bağlı olabileceği kanaati oluşmuştur.

Endojen olarak üretildiği bilinen ghrelinin genel anlamda İ/R hasarını hafifletmesi, İ/R sürecinde plazma ghrelin seviyelerinin değişebileceği fikrini akla getirmektedir. Nitekim, miyokard enfarktüsü geçiren kişilerde plazma ghrelin düzeyinin azaldığı gösterilmiştir [140]. Diğer yandan Rahman ve arkadaşları [141], kardiyopulmoner by-pass ameliyatı olmuş hastalarda, ameliyat sonrası 24.saatte plazmada her iki ghrelin formunun da çarpıcı biçimde arttığını belirtmiş ve bu artışın sistemik vasküler direnç indeksi ile ilgili olabileceğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise İ/R uygulanan grupta açile ghrelin formunun Rahman ve arkadaşlarının çalışmasını destekler nitelikte arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, deaçile ghrelin formunun ise değişmediği tespit edilmiştir. Sonuçlarımızın beyin İ/R'sine bağlı plazma ghrelin düzeylerinin analiz edildiği ilk çalışma niteliğine sahip olması nedeniyle önemli olabileceği ancak mekanizmaya

yönelik ilave çalışmaların yapılmasının gerektiği düşünülmektedir. Bizim projemizde GHR grubunda plazma açile ghrelin seviyesinin arttığı ve bu artışın ghrelin O-açile transferaz (GOAT) ekspresyonundaki artış ve sıçanların aç olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çünkü, Gahete ve arkadaşları [142] primer hipofiz hücre kültürü çalışmalarında açile ghrelinin GOAT ekspresyonunda artışa yol açtığını ve bu artışın deaçile ghrelinin açile forma dönüşünü indüklediğini göstermişlerdir. Diğer yandan aynı araştırmacılar 12 ve 24 saat aç bıraktıkları farelerde, midedeki ghrelin ekspresyonunun ve dolaşımdaki total ghrelin düzeyinin değişmediğini, fakat; dolaşımdaki açile ghrelin ve midedeki GOAT mRNA seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Gahete ve arkadaşlarının [142] bulgularının aksine, Kirchner ve arkadaşları [143], C57B1/6 farelerinde yaptıkları çalışmada 12, 24 ve 36 saat açlığın total ve açile ghrelin seviyesini ciddi biçimde arttırdığını, fakat; midedeki GOAT mRNA miktarını azalttığını bulmuşlardır. Ghrelin tedavisi uygulanan İ/R grubunda açile ve deaçile ghrelin seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu azalmayı açıklayacak herhangi bir mekanizma henüz bilinmemekte ve bu durumun aydınlatılabilmesi için serebral İ/R'nin vasküler endotelyum, doku ghrelin düzeyleri ve GOAT ekspresyonunu nasıl etkilediğinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Serebral iskemi sonrasında süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit radikalinin oluşmasını sağlayan NO'nun aşırı miktarda üretilmesinin nöron ölümüne yol açan mekanizmalarda önemli bir basamak olduğunu öngören pek çok çalışma bulunmaktadır [144, 145]. Daha önce yapılan çalışmalarda, serebral İ/R hasar mekanizmasında NO'nun çok yönlü rol oynadığı vurgulanmıştır. İskemi reperfüzyon sonrasında NO vazodilatasyon oluşturarak serebral kan akışını arttırmakta fakat, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen türleri oluşmasını sağlayarak da glutamat eksitotoksitesine ve serbest radikal kaynaklı nöronal hasara yol açmaktadır [146, 147]. Yapılan literatür taramasında farelerde ortak karotid arterin 10 dakika süreyle oklüde edilmesiyle iskemi oluşturulduğu ve reperfüzyonun 96. saatinde beyinde NO miktarının bir belirteci olan nitrit düzeyinin belirgin olarak arttığının rapor edildiği görülmüştür [148]. Diğer yandan, Maheswari ve arkadaşları [130] sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 120 dakikalık fokal serebral iskemiye takip eden 24. reperfüzyon saatinde nitrit değerlerinde çarpıcı bir artış olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da, bu çalışmalara paralel olarak İ/R sonrası hipokampusta nitrit+nitrat değerlerinin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte ghrelin tedavisi uygulanan gruplarda da nitrit+nitrat seviyelerinde anlamlı bir artış izlenmiştir. Bu artışın NOS enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlerden kaynaklandığı düşünüldüğünden nNOS ve iNOS ekspresyonu immünohistokimyasal olarak analiz edilmiştir.

İskemi/reperfüzyon hasarında, NO üretiminden sorumlu olan NOS enzimlerinin fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Serebral İ/R sürecinde NOS izoformlarının farklı roller oynadığını iddia eden pek çok çalışma bulunmaktadır [149, 150]. Yapılan araştırmalarda beyinde kalıcı fokal iskemi oluşturulmuş ve iskemik çekirdeğin serebral damarlarında eNOS ekspresyonunun 24 saatte maksimum olduğu iNOS ekspresyonunun ise yerleşik ve göçen hücrelerde arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda iNOS indüksiyonunun eNOS ve nNOS

ekspresyonununundan sonra gerçekleştiği ve İ/R'nin özellikle geç fazında karşılaşılan NO üretiminden sorumlu olduğu rapor edilmiştir [20, 21, 149, 151-153]. Yapılan diğer bir çalışmada ise sıçanlara 120 dakikalık fokal serebral iske mi uygulanmış ve reperfüzyonun 15. dakikası ile 24. saatinde kortikal nöronlarda nNOS immünoreaktivitesinde belirgin artış tespit edilmiştir [19]. İske miye bağı lı NOS izoformlarındaki de ğişimlere istinaden Mun ve arkadaşları [150] yaptıkları çalışmada global serebral İ/R uygulanan sıçanlara nNOS, iNOS ve eNOS inhibitörleri vermişler ve nNOS ile iNOS' nin serebral İ/R hasarında nörodejeneratif, eNOS'nin ise nöroprotektif olduğunu ö ne sürmüşlerdir. Bu bilgilerin ışığı altında yaptığımız çalışmamızda İ/R hasarına bağı lı olarak özellikle hipokampal CA3 bölgesinde iNOS ve nNOS ekspresyonunun arttığı ve bu artışın literatür ile uyum içerisinde olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak İ/R'ye bağı lı nitrit+nitrat seviyesindeki artışın nNOS ve özellikle de iNOS immünoreaktivitesinin artışına bağı lı olduğu tespit edilmiştir.

Ghrel in verilen grubun sonuçları de ğerlendirildi ğinde ise iNOS düzeyinde SHAM gruba göre fark bulunmamış, nNOS seviyesinin ise az miktarda arttığı ve bu artışın nitrit+nitrat seviyesindeki yükselmenin nedeni olabilece ği düşünölmüştür. Nitekim, daha önce yapılan çalışmalarda ghrelinin GHSR-1a reseptörüne bağı lanarak G-protein aracılı ğıyla PLC-DAG-IP3 yola ğı üzerinden hücre içi Ca²⁺ miktarını yükseltti ği ve CaMKII bağı mlı eNOS ve nNOS enzimlerinin aktivitesinde artışa sebep olarak NO üretimini arttırdığı gösterilmiştir [93, 154, 155]. Bununla birlikte Gaskin ve arkadaşları [156] fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 100 ng intraserebroventriküler ghrel in uygulamasının hipotalamusta ciddi bir NO artışına sebep olduğunu ve NOS izoformlarının inhibisyonunun ghrelinin hipotalamik etkilerini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. NOS izoformlarının knockout olduğu farelerde yapılan di ğer bir araştırmada ise ghrelinin oreksijenik etkisinin ortadan kayboldu ğu bildirilmiştir [157]. Son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan ghrelinin NO/NOS yola ğı üzerinden öğrenme ve hafızayı etkiledi ği de ö ne sürölmüş olup Carlini ve arkadaşları [93] ghrelinin hipokampusta LTP eş i ğini düşürdü ğünü, NO seviyesini arttırdığını ve nonselektif NOS inhibitörü verildi ğinde ise ghrelinin LTP üzerindeki etkisinin kayboldu ğunu saptamışlardır. Ghrel in verdi ğimiz İ/R grubundaki öğrenme parametrelerindeki düzelmenin Carlini ve arkadaşları tarafından ortaya konan mekanizma ile ilişkili olabilece ği düşünölmüştür.

Ghrel in tedavisi uygulanan İ/R grubunda ise iNOS ekspresyonunun İ/R grubuna göre azaldığı ve bu sonucun Sibilias ve arkadaşları [158] tarafından lezyonlu gastrik mukozada ghrelinin iNOS mRNA'sını azalttı ğını gösteren çalışma ile paralellik gösterdi ği bulunmuştur. İske mi/reperfüzyon uygulanıp ghrel in verilen deney grubunda nNOS izoformunda de ğişiklik olmamış, çünkü hem İ/R hem de ghrel in nNOS immünoreaktivitesinde artışa sebep olmuştur. Bu nedenle İ/R'de nitrit+nitrat artışının kayna ğı her ne kadar iNOS ve nNOS olarak görölse de ghrel in sadece iNOS immünoreaktivitesinde azalmaya sebep olarak NO bağı mlı İ/R hasarını azaltmış gibi görünmektedir. Bu çalışmanın devamında tüm NOS izoformlarının aktivitelerinin de ğerlendirilmesi gerekti ği kanaati hasıl olmuştur.

Global serebral İ/R'nin hipokampal nöronlar üzerindeki haraplayıcı etkisinin gözlemlenebilmesi amacı ile serebral iske mi çalışmalarda yaygın olarak hematoksilen eozin boyaması yapılmaktadır [159-161]. Hematoksilen eozin ile boyanan beyin dokularında genellikle yaşayan nöron sayısı ve eozinofilik nöron

miktarı değerlendirilmektedir [150, 162, 163]. Liu ve arkadaşları [29] tarafından yapılan çalışmada 8 dakika süreyle iskemi oluşturulmuş, reperfüzyonun 72. saatinde çıkarılan hipokampuslar hematoksilen eozin ile boyanmış ve hipokampal piramidal tabakada yaşayan nöron sayısının çarpıcı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada ise gerbillerde 5 dakikalık global serebral iskemi sonrasında reperfüzyonun 24.saatinde hematoksilen eozin boyaması yapılmış ve iskeminin hipokampal CA1 bölgesinde yaşayan nöron sayısını ciddi biçimde azalttığı gösterilmiştir [164]. Bizim alışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde İ/R grubunda özellikle hipokampal CA1 bölgesinde yaşayan nöron sayısında belirgin bir azalma olduğu ve bunun yanı sıra piramidal tabakanın incelendiği tespit edilmiştir. Antioksidan ve nöroprotektif etkileri bilinen ghrelinin tedavi edici ajan olarak verilmesiyle İ/R'ye bağlı nöron sayısındaki azalmanın ve piramidal tabakadaki incelmanin önlendiği ortaya konmuştur.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçları şöylece özetlenebilir:

1. Global serebral İ/R'nin öğrenme ve hafıza bozukluğuna yol açtığı tespit edilmiştir.
2. Global serebral İ/R'ye bağlı öğrenme ve hafıza bozukluklarında oksidan hasarın önemli rol oynadığı saptanmıştır.
3. Öğrenme, hafıza sürecinde ve oksidatif stres oluşumunda önemli rol oynayan NO'nun İ/R hasarında arttığı nitrit+nitrat düzeylerine bakılarak tespit edilmiştir.
4. Antioksidan ve nöroprotektif etkileri olduğu bilinen ghrelinin İ/R'ye bağlı öğrenme ve hafıza bozukluğunu düzelttiği ve nNOS üzerinden etki ederek NO düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir.
5. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde İ/R'ye bağlı öğrenme ve hafıza bozukluklarında ghrelinin tedavi edici ajan olarak kullanılabileceği ancak, mekanizmaya yönelik detaylı araştırmaların gerekliliği ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 2006,**24**:1-21.
2. Saeed SA, Shad KF, Saleem T, Javed F, Khan MU. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Exp Brain Res* 2007,**182**:1-10.
3. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999,**79**:1431-1568.
4. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 1996,**16**:195-201.
5. McGee-Russell SM, Brown AW, Brierley JB. A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res* 1970,**20**:193-200.
6. Cervos-Navarro J, Diemer NH. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit Rev Neurobiol* 1991,**6**:149-182.
7. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol* 1984,**62**:201-208.
8. Ferrer I, Soriano MA, Vidal A, Planas AM. Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction. *Brain Res* 1995,**692**:41-46.
9. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982,**239**:57-69.
10. Bueters T, von Euler M, Bendel O, von Euler G. Degeneration of newly formed CA1 neurons following global ischemia in the rat. *Exp Neurol* 2008,**209**:114-124.
11. Wang JH, Ko GY, Kelly PT. Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity. *J Clin Neurophysiol* 1997,**14**:264-293.
12. Conrad CD. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? *Behav Cogn Neurosci Rev* 2006,**5**:41-60.

13. Li DQ, Duan YL, Bao YM, Liu CP, Liu Y, An LJ. Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Res* 2004,**50**:169-177.
14. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993,**361**:31-39.
15. Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist* 2007,**13**:492-505.
16. Hanbauer I, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 1992,**3**:409-412.
17. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 2007,**137**:1616S-1620S.
18. Dawson VL, Dawson TM. Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1995,**34**:323-342.
19. Murphy S, Gibson CL. Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation. *Biochem Soc Trans* 2007,**35**:1133-1137.
20. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 2000,**29**:1-13.
21. Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol* 1999,**97**:215-220.
22. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997,**28**:1283-1288.
23. Dalkara T, Morikawa E, Panahian N, Moskowitz MA. Blood flow-dependent functional recovery in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1994,**267**:H678-683.
24. El Eter E, Al Tuwajjiri A, Hagar H, Arafá M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2007,**22**:1791-1799.
25. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999,**402**:656-660.
26. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000,**279**:909-913.

27. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, *et al.* Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000,**141**:4255-4261.
28. Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, *et al.* Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One* 2008,**3**:e2026.
29. Liu Y, Wang PS, Xie D, Liu K, Chen L. Ghrelin reduces injury of hippocampal neurons in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion. *Chin J Physiol* 2006,**49**:244-250.
30. McNay EC. Insulin and ghrelin: peripheral hormones modulating memory and hippocampal function. *Curr Opin Pharmacol* 2007,**7**:628-632.
31. Kukan M. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *J Physiol Pharmacol* 2004,**55**:3-15.
32. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005,**39**:841-852.
33. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989,**20**:1627-1642.
34. Belayev L, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: I. Three-dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997,**17**:1266-1280.
35. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989,**20**:1037-1043.
36. Lipton SA. Redox sensitivity of NMDA receptors. *Methods Mol Biol* 1999,**128**:121-130.
37. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 2009,**4**:461-470.
38. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, *et al.* Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 2004,**1**:17-25.
39. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999,**65**:1865-1874.

40. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, *et al.* S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992,**89**:444-448.
41. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, *et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004,**385**:1-10.
42. Small DL, Morley P, Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis* 1999,**42**:185-207.
43. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993,**13**:355-358.
44. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995,**15**:378-384.
45. Maiese K, Boniece I, DeMeo D, Wagner JA. Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity. *J Neurosci* 1993,**13**:3034-3040.
46. Panahian N, Yoshida T, Huang PL, Hedley-Whyte ET, Dalkara T, Fishman MC, *et al.* Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1996,**72**:343-354.
47. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002,**282**:C227-241.
48. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994,**63**:175-195.
49. Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, Moskowitz MA. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994,**14**:924-929.
50. Dalkara T, Yoshida T, Irikura K, Moskowitz MA. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 1994,**33**:1447-1452.
51. Wendel A, Cikryt P. The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Lett* 1980,**120**:209-211.
52. Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993,**71**:725-731.

53. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 2005,**18**:335-350.
54. Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1984,**64**:139-147.
55. Cummings JL, Tomiyasu U, Read S, Benson DF. Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. *Neurology* 1984,**34**:679-681.
56. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986,**6**:2950-2967.
57. Petit CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 1987,**37**:1281-1286.
58. Earnest MP, Yarnell PR, Merrill SL, Knapp GL. Long-term survival and neurologic status after resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest. *Neurology* 1980,**30**:1298-1302.
59. Volpe BT, Hirst W. The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury. *Arch Neurol* 1983,**40**:436-440.
60. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999,**30**:2752-2758.
61. Auer RN, Jensen ML, Whishaw IQ. Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. *J Neurosci* 1989,**9**:1641-1647.
62. Davis HP, Tribuna J, Pulsinelli WA, Volpe BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav* 1986,**37**:387-392.
63. Grotta JC, Pettigrew LC, Rosenbaum D, Reid C, Rhoades H, McCandless D. Efficacy and mechanism of action of a calcium channel blocker after global cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1988,**19**:447-454.
64. Hagan JJ, Beaughard M. The effects of forebrain ischaemia on spatial learning. *Behav Brain Res* 1990,**41**:151-160.
65. Ordy JM, Thomas GJ, Volpe BT, Dunlap WP, Colombo PM. An animal model of human-type memory loss based on aging, lesion, forebrain ischemia, and drug studies with the rat. *Neurobiol Aging* 1988,**9**:667-683.
66. Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J, Davis HP. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. *Stroke* 1984,**15**:558-562.

67. Kumaran D, Udayabanu M, Nair RU, R A, Katyal A. Benzamide protects delayed neuronal death and behavioural impairment in a mouse model of global cerebral ischemia. *Behav Brain Res* 2008,**192**:178-184.
68. Arai A, Larson J, Lynch G. Anoxia reveals a vulnerable period in the development of long-term potentiation. *Brain Res* 1990,**511**:353-357.
69. Izumi Y, Katsuki H, Benz AM, Zorumski CF. Oxygen deprivation produces delayed inhibition of long-term potentiation by activation of NMDA receptors and nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998,**18**:97-108.
70. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.
71. Ganong WF. *Review of medical physiology*. 13th ed. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange; 1987.
72. Andersen P. *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2007.
73. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010,**11**:339-350.
74. Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009,**203**:151-164.
75. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973,**232**:331-356.
76. Haines DE. *Fundamental neuroscience*. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006.
77. Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006,**129**:1659-1673.
78. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Updated ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2005.
79. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992,**89**:4363-4367.

80. Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K. Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 2000,**408**:584-588.
81. Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, *et al.* Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998,**280**:1940-1942.
82. Wu JT, Kral JG. Ghrelin: integrative neuroendocrine peptide in health and disease. *Ann Surg* 2004,**239**:464-474.
83. Dornonville de la Cour C, Lindstrom E, Norlen P, Hakanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004,**120**:23-32.
84. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, *et al.* Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000,**276**:905-908.
85. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, *et al.* The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002,**123**:1120-1128.
86. Sakata I, Yamazaki M, Inoue K, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett* 2003,**342**:183-186.
87. Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, *et al.* Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 2004,**559**:729-737.
88. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005,**85**:495-522.
89. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002,**14**:555-560.
90. Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, *et al.* Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002,**299**:739-743.
91. Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004,**313**:635-641.

92. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, *et al.* Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 2006,**9**:381-388.
93. Carlini VP, Perez MF, Salde E, Schioth HB, Ramirez OA, de Barioglio SR. Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. *Physiol Behav* 2010,**101**:117-123.
94. Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, *et al.* Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006,**536**:171-181.
95. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979,**10**:267-272.
96. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004,**37**:112-119.
97. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005,**38**:1103-1111.
98. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982,**126**:131-138.
99. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976,**72**:248-254.
100. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 2003,**4**:399-415.
101. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008,**371**:1612-1623.
102. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011,**123**:e18-e209.
103. Raz L, Zhang QG, Zhou CF, Han D, Gulati P, Yang LC, *et al.* Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. *PLoS One* 2010,**5**:e12606.
104. Selakovic V, Korenic A, Radenovic L. Spatial and temporal patterns of oxidative stress in the brain of gerbils submitted to different duration of global cerebral ischemia. *Int J Dev Neurosci* 2011.

105. Bendel O, Alkass K, Bueters T, von Euler M, von Euler G. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res* 2005,**1033**:135-142.
106. Samson ML, Kajitani K, Robertson GS. Nitric-oxide synthase mediates the ability of darbepoetin alfa to attenuate pre-existing spatial working memory deficits in rats subjected to transient global ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2010,**333**:437-444.
107. Roberge MC, Hotte-Bernard J, Messier C, Plamondon H. Food restriction attenuates ischemia-induced spatial learning and memory deficits despite extensive CA1 ischemic injury. *Behav Brain Res* 2008,**187**:123-132.
108. Kiryk A, Pluta R, Figiel I, Mikosz M, Ulamek M, Niewiadomska G, *et al.* Transient brain ischemia due to cardiac arrest causes irreversible long-lasting cognitive injury. *Behav Brain Res* 2011,**219**:1-7.
109. Kim YT, Yi YJ, Kim MY, Bu Y, Jin ZH, Choi H, *et al.* Neuroprotection and enhancement of spatial memory by herbal mixture HT008-1 in rat global brain ischemia model. *Am J Chin Med* 2008,**36**:287-299.
110. Wang S, Duan Y, Su D, Li W, Tan J, Yang D, *et al.* Delta opioid peptide [d-Ala², d-Leu⁵] enkephalin (DADLE) triggers postconditioning against transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol* 2011,**658**:140-144.
111. Zhu XH, Li SJ, Hu HH, Sun LR, Das M, Gao TM. Neuroprotective effects of xiao-xu-ming decoction against ischemic neuronal injury in vivo and in vitro. *J Ethnopharmacol* 2010,**127**:38-46.
112. Chen L, Xing T, Wang M, Miao Y, Tang M, Chen J, *et al.* Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *Eur J Neurosci* 2011,**33**:266-275.
113. Atcha Z, Chen WS, Ong AB, Wong FK, Neo A, Browne ER, *et al.* Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2009,**206**:415-427.
114. Nade VS, Kawale LA, Dwivedi S, Yadav AV. Neuroprotective effect of Hibiscus rosa sinensis in an oxidative stress model of cerebral post-ischemic reperfusion injury in rats. *Pharm Biol* 2010,**48**:822-827.
115. Nikonenko AG, Radenovic L, Andjus PR, Skibo GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken)* 2009,**292**:1914-1921.

116. Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *Eur J Pharmacol* 2009,**616**:147-154.
117. Maia FD, Pitombeira BS, Araujo DT, Cunha GM, Viana GS. l-Deprenyl prevents lipid peroxidation and memory deficits produced by cerebral ischemia in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004,**24**:87-100.
118. Ozturk E, Balat O, Acilmis YG, Ozcan C, Pence S, Erel O. Measurement of the placental total antioxidant status in preeclamptic women using a novel automated method. *J Obstet Gynaecol Res* 2011,**37**:337-342.
119. Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, Khuwaja G, Srivastawa P, Khan MB, *et al.* Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Res* 2009,**1292**:123-135.
120. Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, *et al.* Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. *J Med Food* 2006,**9**:537-544.
121. Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, Elsner R. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006,**142**:198-204.
122. Ahmad S, Yousuf S, Ishrat T, Khan MB, Bhatia K, Fazli IS, *et al.* Effect of dietary sesame oil as antioxidant on brain hippocampus of rat in focal cerebral ischemia. *Life Sci* 2006,**79**:1921-1928.
123. Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, Vohora SB. Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J Ethnopharmacol* 2005,**101**:299-307.
124. Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Jeon SE, *et al.* Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res Dev Brain Res* 2004,**152**:11-18.
125. Casado A, de la Torre R, Lopez-Fernandez ME, Gil P, Egido JA. [Antioxidant enzymes in acute cerebral infarction]. *Neurologia* 2004,**19**:5-9.
126. Ghoneim AI, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Denshary ES. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. *Pharmacol Res* 2002,**46**:273-279.
127. Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Futenma A, kato K, Hirano K. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. *Clin Chim Acta* 1994,**229**:123-131.

128. Strand T, Marklund SL. Release of superoxide dismutase into cerebrospinal fluid as a marker of brain lesion in acute cerebral infarction. *Stroke* 1992,**23**:515-518.
129. Alexandrova M, Bochev P, Markova V, Bechev B, Popova M, Danovska M, *et al.* Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *J Clin Neurosci* 2004,**11**:501-506.
130. Maheshwari A, Badgujar L, Phukan B, Bodhankar SL, Thakurdesai P. Protective effect of Etoricoxib against middle cerebral artery occlusion induced transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol* 2011.
131. Simao F, Matte A, Matte C, Soares FM, Wyse AT, Netto CA, *et al.* Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁽⁺⁾K⁽⁺⁾-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *J Nutr Biochem* 2011.
132. Li RC, Guo SZ, Lee SK, Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010,**30**:1874-1882.
133. Hou Y, An J, Hu XR, Sun BB, Lin J, Xu D, *et al.* Ghrelin inhibits interleukin-8 production induced by hydrogen peroxide in A549 cells via NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol* 2009,**9**:120-126.
134. Hedayati N, Annambhotla S, Jiang J, Wang X, Chai H, Lin PH, *et al.* Growth hormone-releasing peptide ghrelin inhibits homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human endothelial cells. *J Vasc Surg* 2009,**49**:199-207.
135. Xu Z, Lin S, Wu W, Tan H, Wang Z, Cheng C, *et al.* Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF-kappaB pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology* 2008,**247**:133-138.
136. Suzuki H, Matsuzaki J, Hibi T. Ghrelin and oxidative stress in gastrointestinal tract. *J Clin Biochem Nutr* 2011,**48**:122-125.
137. Cuellar JN, Isokawa M. Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2011,**60**:842-851.
138. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, *et al.* Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004,**43**:165-170.
139. Hwang S, Moon M, Kim S, Hwang L, Ahn KJ, Park S. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *Endocr J* 2009,**56**:609-617.

140. Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, Richards M. C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003,**310**:567-573.
141. Rahman A, Aydin S, Bayar MK, Sahin I. Changes of ghrelin and brain natriuretic peptide levels in systemic vascular resistance after cardiopulmonary bypass. *J Physiol Biochem* 2008,**64**:221-230.
142. Gahete MD, Cordoba-Chacon J, Salvatori R, Castano JP, Kineman RD, Luque RM. Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Mol Cell Endocrinol* 2010,**317**:154-160.
143. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, *et al.* GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 2009,**15**:741-745.
144. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990,**87**:1620-1624.
145. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994,**78**:931-936.
146. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 2003,**27**:325-355.
147. Helps SC, Sims NR. Inhibition of nitric oxide synthase with 7-nitroindazole does not modify early metabolic recovery following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Res* 2007,**32**:663-670.
148. Gaur V, Kumar A. Protective effect of desipramine, venlafaxine and trazodone against experimental animal model of transient global ischemia: possible involvement of NO-cGMP pathway. *Brain Res* 2010,**1353**:204-212.
149. Togashi H, Mori K, Ueno K, Matsumoto M, Suda N, Saito H, *et al.* Consecutive evaluation of nitric oxide production after transient cerebral ischemia in the rat hippocampus using in vivo brain microdialysis. *Neurosci Lett* 1998,**240**:53-57.
150. Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol* 2010,**43**:230-240.
151. Demerle-Pallardy C, Lonchamp MO, Chabrier PE, Braquet P. Nitric oxide synthase induction in glial cells: effect on neuronal survival. *Life Sci* 1993,**52**:1883-1890.

152. Fassbender K, Fatar M, Ragoschke A, Picard M, Bertsch T, Kuehl S, *et al.* Subacute but not acute generation of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Stroke* 2000,**31**:2208-2211.
153. Iadecola C, Xu X, Zhang F, el-Fakahany EE, Ross ME. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995,**15**:52-59.
154. Slomiany BL, Slomiany A. Ghrelin protection against lipopolysaccharide-induced gastric mucosal cell apoptosis involves constitutive nitric oxide synthase-mediated caspase-3 S-nitrosylation. *Mediators Inflamm* 2010,**2010**:280464.
155. Slomiany BL, Slomiany A. Constitutive nitric oxide synthase-mediated caspase-3 S-nitrosylation in ghrelin protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced salivary gland acinar cell apoptosis. *Inflammopharmacology* 2010,**18**:119-125.
156. Gaskin FS, Farr SA, Banks WA, Kumar VB, Morley JE. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides* 2003,**24**:913-918.
157. Morley JE, Farr SA, Sell RL, Hileman SM, Banks WA. Nitric oxide is a central component in neuropeptide regulation of appetite. *Peptides* 2011,**32**:776-780.
158. Sibilia V, Pagani F, Rindi G, Lattuada N, Rapetti D, De Luca V, *et al.* Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk. *Br J Pharmacol* 2008,**154**:688-697.
159. Cao Y, Mao X, Sun C, Zheng P, Gao J, Wang X, *et al.* Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Brain Res Bull* 2011.
160. Zhang W, Miao Y, Zhou S, Jiang J, Luo Q, Qiu Y. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. *J Clin Neurosci* 2011,**18**:685-689.
161. Satoh K, Niwa M, Goda W, Binh NH, Nakashima M, Takamatsu M, *et al.* Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res* 2011,**1382**:266-274.
162. Ma S, Yin H, Chen L, Liu H, Zhao M, Zhang X. Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats. *J Nat Med* 2011.

163. Matayoshi H, Hirata T, Yamashita S, Ishida K, Mizukami Y, Gondo T, *et al.* Neutrophil elastase inhibitor attenuates hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 2009,**1259**:98-106.
164. Bian Q, Shi T, Chuang DM, Qian Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res* 2007,**1184**:270-276.

ÖZGEÇMİŞ

Göksun BAŞARANLAR, 1985 yılında İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 2003 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü’nde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 2008 yılında aldı ve 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir.