

**RAT SİYATİK SİNİR İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA
ALFA LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Ozan TURAMANLAR

TIP ANATOMİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Oğuz Aslan ÖZEN

Tez No: 2010 - 013

2010 – AFYONKARAHİSAR

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAT SİYATİK SİNİR İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ALFA
LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ETKİSİ**

Dr. Ozan TURAMANLAR

**ANATOMİ (TIP) ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuz Aslan ÖZEN**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
09-TIP-12 proje numarası ile desteklenmiştir**

**Tez No: 013
2010 - AFYONKARAHİSAR**

KABUL VE ONAY

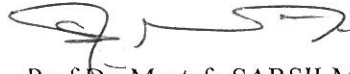
Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi (Tıp) Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2010



Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

Fırat Üniversitesi



Prof. Dr. Oğuz Aslan ÖZEN

Namık Kemal Üniversitesi



Doç. Dr. Ahmet SONGUR

Afyon Kocatepe Üniversitesi



Doç. Dr. Cevdet Uğur KOÇOĞULLARI

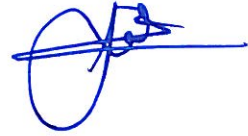
Afyon Kocatepe Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Sevda LAFÇI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Anatomi (Tıp) Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ozan TURAMANLAR'ın "Rat Siyatik Sinir Iskemi-Reperfüzyon Hasarına Alfa-Lipoik Asit'in Koruyucu Etkisi" başlıklı tezi 30/12/2010 günü saat 10:00'de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim sırasında bilgi, birikim ve deneyimlerini bana aktaran; tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Oğuz Aslan ÖZEN'e,

Doktora eğitimim ve tez süresi içinde karşılaştığım soru ve sorunların çözümü için elinden gelen gayreti gösteren Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Ahmet SONGUR'a,

Doktora eğitimime ve tez çalışmasına katkılarından dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi'nden hocalarım Doç. Dr. Cevdet Uğur KOÇOĞULLARI, Doç. Dr. Hakan MOLLAOĞLU, Doç. Dr. Murat TOSUN, Doç. Dr. Murat YAĞMURCA, Doç. Dr. Mehmet Ali SÖZEN, Doç. Dr. Kağan ÜÇOK, Yrd. Doç Dr. Sevda LAFCI ve Yrd. Doç. Dr. Nermin Nüket MAS; Namık Kemal Üniversitesi'nden Öğr. Gör. Cevat AKTAŞ; Süleyman Demirel Üniversitesi'nden Yrd. Doç Dr. Efkan UZ'a,

Dostluklarını ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Muhsin TOKTAŞ, Dr. Yücel GÖNÜL, Arş. Gör. Sezer AKÇER, Ozan ALKOÇ, Ramazan UYGUR, Veli ÇAĞLAR, Tolgahan ACAR, Murat KUŞ ve Doç. Dr. Murat COŞAR'a,

Hayatım boyunca sevgi, ilgi ve desteklerini kalbimde hissettiğim; bir ferdi olmaktan onur duyduğum aileme,

Birbirimize olan sevgi ve saygımızla hayatı paylaştığımız; sabrı, sempati ve ilgisi ile her konudaki zorlukların üstesinden gelebilmemi sağlayan sevgili eşim Hanım Selin TURAMANLAR ve canım kızım Aylin TURAMANLAR'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Toprak ve deniz kokulu

Çocukluk anılarımın, ihtiyar kahramanlarına

Mehmet TURAMANLAR ve Halil Hilmi ÜNAL anısına..

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller ve Resimler	ix
Tablolar	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Alfa Lipoik Asit	2
1.1.1. Tarihçe	5
1.1.2. Bir Antioksidan Olarak Lipoik Asit	5
1.1.3. Kaynakları	8
1.1.4. Biyosentezi	9
1.1.5. Farmakokinetiği	9
1.1.6. Etki Mekanizmaları	11
1.1.7. Klinik Endikasyonları	12
1.1.8. Dozaj	24
1.1.9. Yan Etkiler ve Toksisite	24
1.2. Antioksidanlar	25
1.3. Sinir Sistemine Genel Bakış	27
1.3.1. Sinir Sisteminin Bölümleri	28
1.3.1.1. Periferik Sinir Sistemi	29
1.3.1.2. Plexus Sacralis	31
1.3.1.3. Nervus Ischiadicus	32
1.3.2. Sinir Sisteminin Gelişimi	34
1.3.3. Periferik Sinirlerin Kanlanması	35

1.3.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Deneysel Hayvanları	40
2.2. Deneysel Çalışma Yöntemi	40
2.3. Histopatolojik İnceleme	43
2.3.1. Hematoksilen-eozin boyama metodu	44
2.3.2. İmmünohistokimya boyama metodu	46
2.4. Biyokimyasal Analiz	47
2.5. İstatistiksel Analiz	49
3. BULGULAR	50
3.1. Histolojik Bulgular	50
3.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	59
3.3. Biyokimyasal Parametreler	62
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ	74
ÖZET	75
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER ve KISALTMALAR**Simgeler**

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
Pb^{2+}	: Kurşun iyonu
Cu^{2+}	: Bakır iyonu
Zn^{2+}	: Çinko iyonu
Mn^{2+}	: Manganez iyonu
Cd^{2+}	: Kadmiyum iyonu
Ni^{2+}	: Nikel iyonu
Hg^{2+}	: Civa iyonu
$\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}$: Demir iyonları
Co^{2+}	: Kobalt iyonu
O^{2-}	: Oksijen iyonu

Kısaltmalar

μm	: Mikrometre
a.	: Arteria
ALA, α-LA	: Alfa lipoik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
AIDS	: Kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu
AMP	: Adenozin mono fosfat
AMPK	: Adenozin mono fosfat kinaz
Co-A, Asetil-CoA	: Koenzim A, Asetil Koenzim A
CAT	: Katalaz
DHLA	: Dihidro lipoik asit

DNA	: Deoksiribonükleik asit
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GR	: Glutatyon redüktaz
GPx, GSHPx	: Glutatyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
H-E	: Hematoksilen-eosin boyama
i.v	: İntravenöz
i.p	: İntraperitoneal
I/R	: İskemi/Reperfüzyon
LA	: Lipoik asit
m.	: Musculus
mikroM	: Mikromol
MDA	: Malondialdehid
n.	: Nervus
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaCl	: Sodyum klorür
NO	: Nitrik oksit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER ve RESİMLER

	Sayfa No
Şekil 1.1: α - Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.	3
Şekil 1.2: Yan zincir bağlayarak modifiye olan lipoik asit (lipoil-).	3
Şekil 1.3: Piruvat dehidrogenaz enzim kompleksinde yer alan lipoik asidin asetil CoA oluşmasındaki metabolik fonksiyonu.	4
Şekil 1.4: Hücrede vitamin E, ubiquinol, vitamin C glutatyon ve R-lipoik asit arasındaki redoks döngüsündeki antioksidan moleküller arasındaki etkileşim.	7
Şekil 1.5: Miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin yapısı ve bağ doku kılıfları.	30
Şekil 1.6: Nöral borunun gelişimi.	34
Şekil 1.7: Periferik siniri besleyen damarların organizasyonu.	35
Şekil 1.8: Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması.	38
Şekil 3.1: Gruplar arasındaki miyelin dejenerasyonu değişiklikleri.	51
Şekil 3.2: Gruplar arasındaki vasküler proliferasyon değişiklikleri.	52
Şekil 3.3: Gruplar arasındaki vasküler konjesyon değişiklikleri.	53
Şekil 3.4: Gruplar arasındaki SOD enzim aktivite değişiklikleri.	63
Şekil 3.5: Gruplar arasındaki MDA enzim aktivite değişiklikleri.	64
Şekil 3.6: Gruplar arasındaki GSH-Px enzim aktivite değişiklikleri.	64
Şekil 3.7: Gruplar arasındaki NO enzim aktivite değişiklikleri.	65
Resim 2.1: Rat siyatik sinirinin rezeksiyon öncesi görünümü.	41
Resim 2.2: Rat abdominal orta hattı üzerinden laparotomi yapıldığı andaki görünümü.	42
Resim 2.3: Rat aorta abdominalise iskemi uygulanan yerin görünümü.	43
Resim 3.1: Grup 1'e ait rat siyatik sinir dokusundan histolojik bir görünüm.	54
Resim 3.2: Grup 3'deki siyatik sinirine ait histolojik bir görünüm.	55
Resim 3.3: Grup 4'e ait siyatik sinirin histolojik bir görünümü.	56
Resim 3.4: 5. Gruba ait histolojik bir görüntü.	57
Resim 3.5: 6. Gruba ait histolojik bir görünüm.	58
Resim 3.6: Sinir dokusuna ait farklı gruplardaki fibronektin immun reaktivitesi gösteren ışık mikroskopik görüntüler.	61

TABLULAR

	Sayfa
	No
Tablo 1.1: α - LA ve DHLA tarafından yakalanan radikaller.	6
Tablo 1.2: α - LA ve DHLA tarafından şelasyon yapılan geçiş metalleri.	6
Tablo 1.3: Seddon ve Sunderland sınıflamalarına göre sinir yaralanmalarının dereceleri.	37
Tablo 2.1: Doku Fiksasyonu.	44
Tablo 2.2: Uygulanan Hematoksilen & Eosin Boyama Prosedürü.	45
Tablo 3.1: Gruplara ait histolojik değişikliklerin skorlarını gösteren tablo.	50
Tablo 3.2: Kontrol, sham ve deney grupları arasındaki fibronektin immün reaktivitelerinin yoğunluğunun semikantitatif olarak değerlendirilmesi.	60
Tablo 3.3: SOD ve GSHPx enzim aktiviteleri ile MDA, NO düzeyleri.	62

1. GİRİŞ

Periferik sinirlerin başlıca yaralanma mekanizmaları gerilme, laserasyon ve kompresyondur. Kompresyon tipi yaralanmalar iki temel patolojik mekanizmayla total motor ve duyu kaybına yol açabilir. Bu mekanizmalar şunlardır: 1) Mekanik kompresyon 2) İskemi. Kısa süreli iskemide, histolojik değişiklikler genellikle geri dönüşümlüdür. Şiddetli iskemik hasara uğramış sinirde, genellikle fonksiyonun kaybolabileceği ve tam bir iyileşmenin oluşmayabileceği kabul edilmektedir. Periferik sinir yaralanmaları tamirinde, mikrocerrahi uygulamalarının yaygın olarak kullanılması, histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerin gelişmesi neticesi ile büyük oranda artış göstermiştir (Burnett ve Zager, 2004; Akan, 2009; Robinson, 2000; Frostick ve ark., 1998).

Lipoik asit (LA)'i ideal bir antioksidan yapan özellikler: Redükte ve okside formlarının antioksidan etkiye sahip olması, hızlı bir şekilde absorbe edilmesi, hem sıvı hem de lipit içinde fazla çözünmesi, şelat yapma özelliğine sahip olmasıdır. LA, tüm antioksidanların en etkili olanıdır. Bunu aşağıdaki veriler desteklemektedir:

- LA, serbest radikallere karşı çok reaktiftir. Vitamin C ve E rejenerasyonu yapabilir ve glutatyonun doku düzeylerini artırır.

- LA, mideden kolayca emildiği için oral olarak alınabilir. Kan- beyin bariyerini geçebilir ve profilaktik ve terapötik dozlarda toksik etki göstermez. Çok sayıda klinik ve deneysel çalışmada LA'nın diyabet, ateroskleroz, katarakt, nörodejeneratif hastalıklar, karaciğer hastalıkları ve AIDS'de yararlı etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır.

- LA'nın yaş ile ilgili hastalıklarda hafiflemeye yol açtığını ön gösteren çalışmalar umut vericidir (Güvenç, 2008; Bilska ve Wlodek, 2005).

LA, uzun zamandır alkole bağlı karaciğer hasarı, mantar zehirlenmesi, diyabet, glokom, radyasyon hasarı, chagas hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi ve

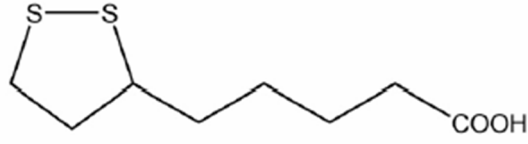
reperfüzyon (I/R) hasarı, ağır metal zehirlenmesi ve HIV gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Pfaffly, 2001).

Bu çalışma ile ratlarda I/R sonrası siyatik sinir üzerine alfa-lipoik asit (ALA)'in koruyucu etkisi ışık mikroskopik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilecektir. ALA'nın siyatik sinir üzerine koruyucu etkisi kanıtlanırsa, çeşitli nedenlerle siyatik sinir hasarı oluşma riski olan ya da oluşmuş hastalara uygun dozda ALA vererek bu hasarı durdurabilir ya da önleyebiliriz.

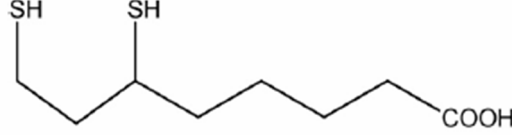
1.1. Alfa lipoik asit

LA, pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde ve doğal olarak bulunan bir bileşiktir. 1940'ların sonlarında, bir büyüme faktörü gibi olduğu dikkat çekmiş ve bazı mikroorganizmalarda pirüvat oksidasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Sonraki yıllarda moleküler yapı açığa kavuşmuş ve "1,2-dithiolane-3 pentanoic acid" olarak adlandırılmıştır. Aynı zamanda LA'ya, "thioctic acid", "1,2- dithiolane-3-valeric acid" ve "6,8-thioctic acid" isimleri de verilmektedir. Endojen LA, birçok multi enzim kompleksinin parçası olarak proteinlere bağlıdır. Bu enzimlere örnek olarak pirüvat dehidrogenaz kompleksi, α -ketogluterat dehidrogenaz kompleksi ve glisin parçalayıcı sistem verilebilir. Memeli dokuları, 5-25 nmol/g LA içerir fakat pratik olarak hemen hemen tamamı proteine bağlı formda bulunmaktadır (Kramer ve ark., 2002; Pfaffly, 2001).

ALA, sekiz karbondan oluşur ve ditiolan halkasında iki sülfür atomunu içermektedir. 6 ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler ile kapalı bir halka meydana getirdiği halde LA'nın redükte şekli olan dihidrolipoik asit (DHLA) ise açık zincir şeklindedir. DHLA'nın 6. ve 8. pozisyonlarında bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır (Cadenas, 2001; Güvenç, 2008).



α - Lipoik Asit (LA)

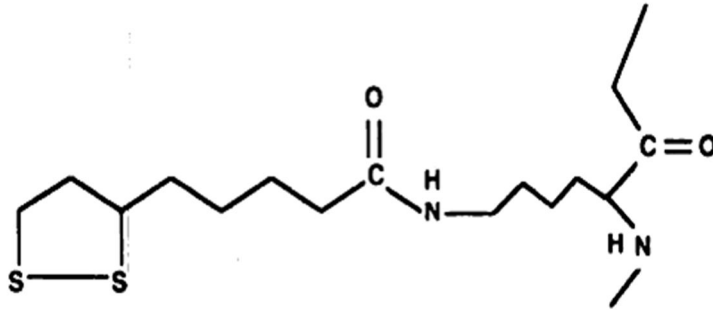


Dihidrolipoik Asit (DHLA)

Şekil 1.1: α - Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

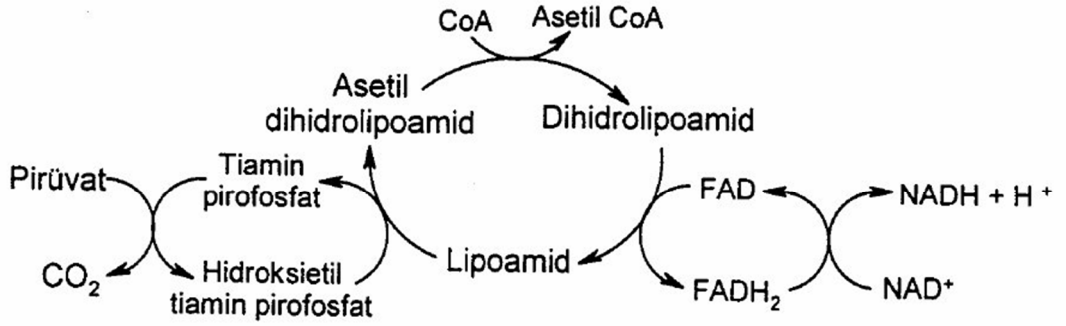
LA, tiyol içeren bir bileşiktir. Diğer tiyol bileşiklerinden en önemli farkı LA ve DHLA kimyasal reaktivitesinin, ditiolan halkasında odaklanmış olmasındandır. LA'nın halkasal yapısında okside ditiolan üzerinde bükülme gerilimi, molekülde indirgenme için büyük bir eğilime neden olur (Biewenga ve ark., 1997).

LA molekülünün bir şiral merkezi vardır ve doğal olarak bulunan LA, R formundadır. Lisin ile amid bağı kurmak suretiyle farklı komplekslere bağlanınca LA'ya lipoil grubu denir (Pfaffly, 2001).



Şekil 1.2: Yan zincir bağlayarak modifiye olan lipoik asit (lipoil-) (Rucker ve Wold, 1988).

LA, insanlarda enerji formasyonu içeren çeşitli 2-oxo asit dehidrogenazların parçasıdır. Bir kofaktör gibi davranarak, 2-oxo asit dehidrogenaz multienzim komplekslerinin lizin kalıntılara bağlanmıştır. LA, açil gruplarını bağlar ve onları enzim kompleksin bir parçasından diğerine transfer eder. Bu işlem boyunca LA, lipoamid dehidrogenaz tarafından reokside olduktan sonra DHLA'ya indirgenir. Bu enzim mitokondride bulunur ve redüksiyon için gerekli elektronları sağlamak için NADH kullanır. LA ve DHLA bir redox çifti gibi davranabilir, dehidrogenazın substratından NAD'a elektronlar taşınır (Pfaffly, 2001; Kramer ve ark., 2002).



Şekil 1.3: Pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksinde yer alan lipoik asidin asetil CoA oluşmasındaki metabolik fonksiyonu (Güvenç, 2008).

LA, mitokondriyal enzimlerde kofaktör olarak rol oynar. ALA suda çözünebildiği için sitozole geçebilir ve serbest radikalleri oluşturduğu mitokondride temizleyebilir. Yaş ve hastalıkla birlikte serbest radikaller artmakta ve bu duruma oksidatif stres denmektedir. Serbest radikallerin aşırı üretimi veya antioksidanlar tarafından ortamdaki temizlenmesindeki yetersizlik, protein lipid ve DNA hasarına yol açmaktadır. Serbest radikal hasarının ilk hedefi, oluştuğu kaynağa yakın olduğu mitokondri bileşenleridir. Mitokondri DNA'sına, uzun süreli ve çok sık tekrarlayan serbest radikal saldırıları, mutasyon frekansını arttırmasına ve bu da işlevi bozuk olan protein üretimine neden olmaktadır (Cadenas, 2001; Evans ve Golfine, 2000).

ALA ve DHLA'nın saptanması için kullanılan yöntemler arasında mikrobiyolojik assay, kolorimetrik assay, gaz kromatografisi, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi, yüksek performans likit kromatografisi, yüksek performans likit kromatografisi- elektrokimyasal saptama (HPLC-EC), kapiller elektroforez, enzim immunoassay bulunur. HPLC-EC, serbest ALA ve DHLA'nın birbirinden bağımsız olarak saptanmasına olanak veren az sayıdaki yöntemlerden birisidir. Çoğu yöntem ise sadece total LA'yı saptamaktadır. Total LA da bağlı, serbest, redükte ve okside formları içermektedir (Pfaffly, 2001).

1.1.1. Tarihçe

ALA, ilk olarak 1937'de Snell ve arkadaşları tarafından patates ekstraktında bulundu. 1951'de Reed ve arkadaşları, karaciğer tortusunun 100 tonundan 30 miligram LA arıttılar. 1966'da Alman doktorlar tarafından karaciğer sirozu, mantar zehirlenmesi, ağır metal toksisitesi ve diyabetik nöropatili hastalara rasemik LA verilmeye başlandı. Gerçekte bu tedavinin temelini, karaciğer sirozu, diyabetes mellitus ve polinöropati hastalarındaki LA seviyelerinin düşüklüğünü gözlemlemekten kaynaklıdır. 1980'lerde ise ALA'nın güçlü bir antioksidan olduğu farkına varıldı (Snell ve ark, 1937; Reed ve ark, 1951; Kramer ve ark., 2002).

1.1.2. Bir Antioksidan Olarak Alfa Lipoik Asit

Bir antioksidanı incelerken, bazı noktalar değerlendirilmelidir. Bunlar: serbest radikalleri engelleyebilme, metallerle şelasyon yapabilme, diğer antioksidanlarla etkileşimi, biyoyararlanım ve hücre konsantrasyonu, gen ekspresyonu üzerine etkileridir. Birçok antioksidanın aksine DHLA ve ALA formlarının her ikisi de antioksidan gibi rol alabilmektedir. Çeşitli reaktif oksijen moleküllerini de direkt

olarak uzaklaştırabilmektedir. ALA ve DHLA çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak davranmaktadır (Pfaffly, 2001).

Tablo 1.1: α - LA ve DHLA tarafından yakalanan radikaller (Pfaffly, 2001).

RADİKALLER	α -LA tarafından yakalananlar	DHLA tarafından yakalananlar
Hidroksi Radikali (OH \cdot)	+	+
Singlet Oksijen (1O_2)	+	+
Hidrojen Peroksit (H $_2$ O $_2$)	-	-
Peroksinitrit (ONOO $-$)	+	+
Süperoksit Radikali (O $_2^{\cdot-}$)	-	+
Lipit peroksil Radikali (LOO \cdot)	-	+
2- amidopropan (ABAP)	-	+
Hipokloröz Asit (HOCl)	+	+
Peroksil Radikali (CCl $_3$ O $_2\cdot$)	+	+

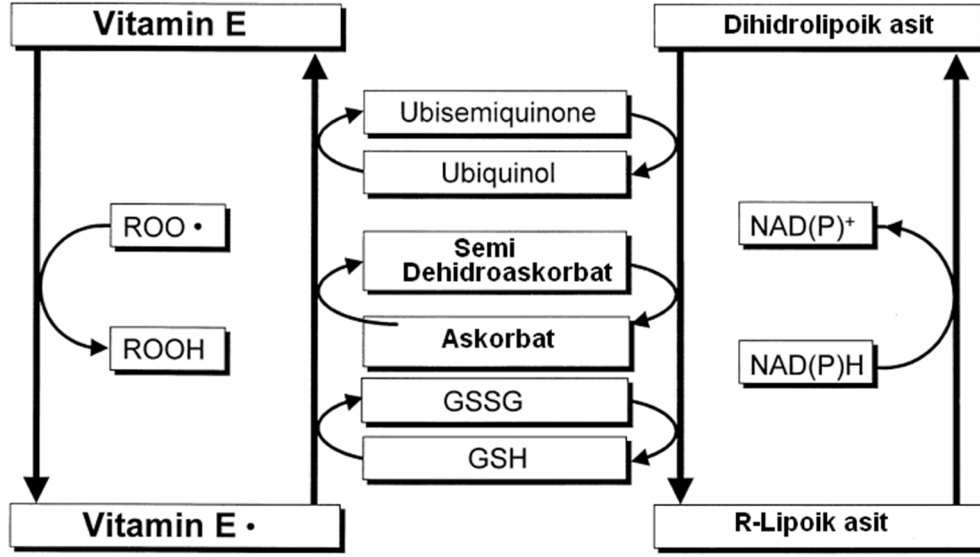
LA, bazı geçiş metalleri ile şelasyon yapabilir (Pfaffly, 2001).

Tablo 1.2: α - LA ve DHLA tarafından şelasyon yapılan geçiş metalleri (Pfaffly, 2001).

METAL	α - LA	DHLA
Pb $^{2+}$	+	+
Cu $^{2+}$	+	+
Zn $^{2+}$	+	+
Mn $^{2+}$	+	
Cd $^{2+}$	+	
Co $^{2+}$		+
Hg $^{2+}$		+
Fe $^{3+}$ /Fe $^{2+}$	+	+
Ni $^{2+}$		+

α - LA, Vitamin C, Glutasyon (GSH) ve dolaylı olarak da Vitamin E'yi rejenere edebilir. Vitamin E, hücre zarının lipit tabakasında bulunan bir antioksidandır. Lipit radikallerinin başlattığı zincirleme reaksiyonları durdurur. Vitamin C de α - tokoferol radikali ile reaksiyona girer ve bu radikali lipit tabakadan uzaklaştırarak sitozole aktarır. Glukoz ve Vitamin C, çoğu hücreye girebilmek için aynı taşıyıcıları kullanır. Diyabetli hastalarda glukoz fazlalığı, taşıyıcı kapasitesini doldurduğu için hücre içine giren Vitamin C miktarını azaltır. LA, hücre içindeki Vitamin C ve E'yi rejenere

ederek bu durumu azaltabilir. Aynı zamanda Vitamin C'nin prooksidan etkisini azaltmaya yardımcı olur. Hayvan deneylerinde LA verilmesinin Vitamin C eksikliğinin etkilerini önleyebildiği gösterilmiştir (Pfaffly, 2001).



Şekil 1.4: Hücrede vitamin E, ubiquinol, vitamin C glutatyon ve R-lipoik asit arasındaki redoks döngüsündeki antioksidan moleküller arasındaki etkileşim (Güvenç, 2008).

DHLA da güçlü bir indirgendir. 1988'de okside glutatyon (GSSG) ve onun indirgenmiş formu olan GSH, DHLA tarafından indirgendiği bulunmuştur. Burada DHLA'nın indirekt antioksidan aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Bu sistemde GSH, lipid reksidasyonuna karşı kısa süreli korunur. Bu inhibisyon, E vitaminin varlığına bağlıdır. Okside formu olan GSSG, lipid peroksidasyonun inhibisyonunda aktif değildir. Bununla birlikte GSSG ile DHLA kombine olduğu zaman lipid peroksidasyon inhibitörüdürler. Bu indikatörler, DHLA tarafından GSSG'yi, GSH'a indirgeyenlerdir. LA'nın glutatyonu rejenere etme yeteneğinin yanında de novo sentezini de arttırabildiğini gösteren kanıtlar da vardır. Aynı zamanda DHLA, protein

tamirine yardımcı olmaktadır. Peptid metiyonin sülfoksit redüktaz (PMSR) enzimi, okside olmuş metiyonin kalıntılarını tamir eder. Bu enzim elektron kaynağı olarak redükte tiyoredoksine ihtiyaç duymaktadır. DHLA, hücrede redükte tiyoredoksin düzeyini arttırabilmektedir. Hem LA hem de DHLA'nın farklı antioksidan özellikleri var olup aynı zamanda DHLA'nın prooksidan özellikler de bulunmaktadır. DHLA şelasyon ile ve ⁺³ değerlikli demiri, ⁺² değerlikli demire indirgeyerek hücredeki Fe²⁺ göreceli miktarını arttırabilir (Kramer ve ark., 2002; Pfaffly, 2001; Evans ve Goldfine, 2000).

Bazı özellikleri ALA'yı diğer antioksidanlardan ayırır. ALA, insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenebilir. Vitamin C (suda çözünen) ve vitamin E (yağda çözünen)'nin tersine, hücrenin gerek yağdan gerekse sudan zengin bölümlerinde serbest radikalleri nötralize eder. Açıl gruplarını bağlar ve bunları enzim kompleksinin bir parçasından diğer parçasına transfer eder. Bu süreçte LA, dihidro lipoik asite indirgenir ve bu da lipoamid dehidrogenaz (lipDH) enzimi tarafından tekrar yükseltilir ve NADH da oluşur. Genel olarak LA ve DHLA, redoks çifti olarak davranır. Elektronları dehidrogenazın substratından NAD⁺ ya taşır. Hem yükseltgenmiş hem de indirgenmiş formları antioksidan olarak işlev yapar (Carreau, 1979; Packer ve ark., 1995).

LA'yı ideal bir antioksidan yapan özellikleri vurgulamak istersek:

- Redükte ve okside formlarının antioksidan etkiye sahip olması,
- Hızlı bir şekilde absorbe edilmesi,
- Hem sıvı, hem de lipit fazla çözünmesi,
- Şelat yapma özelliğine sahip olmasıdır (Güvenç, 2008).

1.1.3. Kaynakları

Günlük diyetimiz LA içerir. Özellikle yüksek metabolik aktivitesi olan dokulardan elde edilen yiyeceklerde fazla miktarda LA bulunur (Herbert ve Guest, 1975).

Domuz kalbi gibi metabolik bir organdan elde edilen ette LA miktarı 1.1-1.6 mg/kg iken dana etinde 0.07-0.15 mg/kg'dır. Diyetteki LA'nın çoğu multienzim komplekslerinden kaynaklandığını göstermektedir. Proteolitik enzimler, LA ile lizin arasındaki peptid bağımlı etkin bir biçimde kıramaz. Dolayısıyla sindirimden sonra LA'nın lipoillisin olarak emildiği öne sürülmüştür (Mattulat, 1992).

Sebzeler ve hayvan dokuları az miktarlarda lipoillizin formunda olan R-LA içerir. R-LA'nın en yaygın bitki kaynakları ıspanak, brokoli ve domatestir. Hayvan dokularında en yüksek lipoillizin konsantrasyonu böbrek, kalp ve karaciğerdedir. En düşük lipolizin konsantrasyonu ise bahçede yetişen bezelyelerde, brüksel lahanasında ve pirinç kepeğinde bulunmuştur. (Sen ve Packer, 2000).

1.1.4. Biyosentezi

LA mitokondride, oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentezlenmektedir. LA'daki sekiz karbon birimi oktanoik asitten sağlanmaktadır ve iki karbon sülfür bantlarının oluşumu LA'ya yol açmaktadır. Mitokondrial beta-oksidasyon reaksiyonunun LA metabolizmasında major rol oynadığı görülmüştür (Karaca, 2007).

1.1.5. Farmakokinetiği

İster besinlerden ister biyosentezden kaynaklansın sadece çok az miktarda serbest LA dolaşıma katılır. LA'nın nispeten düşük biyoyararlanımı, yüksek ilk geçiş etkisine bağlanabilir. Oral verildiğinde % 93' den fazlası barsaklardan emilir ve karaciğerde ise metabolize olarak % 20–30 ilk geçiş etkisine uğrar ve ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptiheksanoik aside metabolize olarak idrarla atılır (Cremer ve ark., 2006).

Vücutta doğal olarak bulunan ALA'nın miktarı, antioksidan etkiyi göstermek için yeterli olmayabilir. O yüzden diyetle dışardan takviyesi gerekmektedir. Oral uygulamalardan sonra serbest LA, göreceli olarak yüksek miktarlarda bulunur. LA verilmesinden sonra kan plazmasında ve dokuda konsantrasyonu saptanabilir. İnsan farmakokinetik çalışmalarında LA'in hem oral hem de intravenöz verilmesinden sonra plazma yarı ömrünün 30 dakika olduğu bulunmuştur. Oral alınan LA, hızla emilir ve 600 mg'a kadar olan dozlarda maksimum plazma konsantrasyonuna 30/60 dakika içinde ulaşılır. 200 mg'lık tek bir oral doz alımından sonra mutlak biyoyararlanım, yaklaşık %30'dur. Ayrıca tekrarlayan oral alımlardan sonra bile plazma akümüülasyonu görülmemektedir. Muhtemelen bu, kısa plazma yarı ömrüne ve presistemik eliminasyona bağlıdır. LA'nın terapötik dozu diyetle alınan miktarın çok üzerindedir. Ratlar için LD₅₀ 400- 500 mg/kg'dır (Srinivasa ve ark., 2007; Teichert ve Preiss, 1995; Evans ve Goldfine, 2000; Pfaffly, 2001).

LA; mitokondriye sahip hücrelerde dihidrolipoamid dehidrogenaz ile NADH-bağımlı bir reaksiyon ile dokular ve hücreler tarafından DHLA'ya indirgenir. Bu iki form oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşmektedir (Güvenç, 2008).

ALA, bir asimetrik karbon içerir ve iki olası optik izomeri vardır. Bunlar, R-LA ve S-LA olarak adlandırılır. Doğal olarak bulunan ALA, R konfigürasyonundadır. Bir proteine bağlıdır ve alfa keto asit ile aminoasitlerin katabolizması ve enerji üretimi ile ilgili çeşitli mitokondriyal enzim kompleksleri için esansiyel bir kofaktör olarak işlev görür. Besin desteklerinde ALA, tipik olarak ya sadece R-ALA ya da R-ALA ve S-ALA'nın rasemik karışımı (RS-ALA) olarak bulunur. ALA'nın oral rasemik karışımlarının kullanıldığı insan çalışmalarında R-ALA'nın plazma konsantrasyonlarının, S-ALA'ninkine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada, LA'nın rasemik karışımının 50 ile 600 mg oral verilmesinden sonra R-ALA'nın maksimum plazma konsantrasyonun S-ALA'ninkinin iki katı olduğu bulunmuştur. Bir çalışmada, S formunun izole hücrelerde ATP üretmediğini, hücre membran akıcılığını azaltma eğiliminde olduğu ancak R formunun ise membran akıcılığı ve transportunu arttırdığı bildirildi.

Ökaryotik hücreler tarafından alındığında her iki enantiomer tüm hücrelerde DHLA formuna dönüştürülür (Bustamante ve ark., 1998; Biewenga ve Bast, 1995; Breithaupt-Grogler ve ark., 1999; Kagan ve ark., 1992).

LA, mitokondride yer alan, glukozdan enerji oluşturan yollarda önemli rol oynar (Evans ve Goldfine, 2000).

R-LA doğal olarak 5 mitokondrial proteinde kofaktör olarak bulunmaktadır:

- 1- Pirüvat kompleksinin açıl transferaz bileşimi
- 2- Alfa ketogluterat
- 3- Bağlı zincirli alfa ketogluterat dehidrogenaz kompleksleri
- 4- Pirüvat dehidrogenaz kompleksinde protein X
- 5- Glisin bölünme sisteminde H protein (Ersoy ve Bayşu, 1986).

α -LA suda tamamen çözünmese de metanol, etanol ve eter gibi bazı organik çözücülerde çözünür (Packer ve ark., 1995).

1.1.6. Etki Mekanizmaları

LA ve DHLA, metal şelatları oluşturarak canlılardaki ağır metalleri yok eden, serbest radikalleri süpüren ve aynı zamanda askorbik asit, ubikinon ve glutatyon gibi antioksidanları, radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenilenmesini sağlayan, güçlü birer antioksidandırlar (Güvenç, 2008).

ALA, hem yağda hem de suda çözünen ortamlarda güçlü bir antioksidandır. Ayrıca antioksidan etkisi hem indirgenmiş hem de yükseltgenmiş formlarında görülür. DHLA, askorbik asidi dehidroksiaskorbik asitten direkt olarak, E vitaminini indirekt olarak rejenere edebilir. Podda ve ark. (1994), E vitamininden mahrum bırakılan farelerin, bu vitamene bağlı oluşan semptomları azalttığı; ancak E

vitamininin dokudaki konsantrasyon düzeylerini korumada herhangi bir etkisinin olmadığını saptadılar (Scholich ve ark., 1989).

LA, proteinlere bağlıdır ve dolayısıyla insanda serbest LA saptanmamıştır. Ama terapötik uygulamalardan sonra dolaşımında serbest LA bulunabilir. Muhtemelen terapötik etkiler serbest, bağlı olmayan LA'dan kaynaklanır. (Hermann ve ark., 1996; Teichert ve Preiss, 1995).

LA'nın diyabetik komplikasyonları önlemedeki yararlarını açıklayabilecek mekanizmalar protein glikozilasyonunu önlemesi ve aldoz redüktaz enzimini inhibe etmesidir. Bu inhibisyonun sonucu olarak glikoz ve galaktozun sorbitole dönüşümünü inhibe eder. Özellikle diyabetik polinöropatiye antioksidan ilaç kullanarak yaklaşım, terapötik girişimler için ümit vadeden yaklaşımlar ortaya çıkarabilir. Oksidatif stresin diyabet patolojisinin bir parçası olduğu gösterildi. Oksidatif stresin insüline bağımlı olmayan diyabetin oluşumunda rolü olduğu öne sürüldü. Klinik çalışmalarda göreceli olarak kısa olan 3 haftalık süre içerisinde LA, polinöropatide düzelleme oluşturmadığı saptandı. LA'nın faydası, ağrı ve parestezi gibi nöropatik şikayetleri azaltmasıdır (Monograph, 2006; Ziegler ve ark., 1995; Salonen ve ark., 1995).

1.1.7. Klinik Endikasyonları

Literatürde ALA'nın, çeşitli hastalıklardaki ve vücut sistemleri üzerine etkilerini inceleyen oldukça fazla sayıda yayımla karşılaştık. Aşağıda, ALA'nın, bazı vücut sistemleri ve bu sistemlerde görülen hastalıklar ile spesifik ve metabolik hastalıklardaki etkilerini inceleyen önemli birtakım araştırmaları derledik.

Kardiyovasküler Sistem ve Hastalıkları

Miyokardiyal reperfüzyon hasarının gelişmesinde reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve mitojen aktif protein (MAP) kinaz büyük rol oynamaktadır. ALA, anti-apoptotik etkisi ile kardiyoprotektif etki gösterebilmektedir. Reperfüzyondan önce uygun dozlarda ALA takviyesinin miyokardiyal reperfüzyon hasarından koruyabildiği bildirildi (Oh ve ark., 2009).

Fraktalkin, proinflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilen endotelial hücrelerdeki bir adezyon molekülüdür. LA'nın kalp ve bağırsakta lipopolisakkarit ile indüklenmiş fraktalkin protein ekspresyonunda ve endotelin-1 pozitif hücrelerin infiltrasyonunu baskıladığı ve lipopolisakkarit ile indüklenmiş miyokardiyal disfonksiyonuna karşı koruyucu etkinliği gösterildi. Başka bir çalışmada, kalpte lipopolisakkarit ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı ALA'nın etkinliği araştırıldı ve ALA'nın erken dönemde verilmesinin kalpte endotoksin ile indüklenmiş oksidatif hasarı azaltmada ve glutasyon redoks sistemini iyileştirmede yüksek derecede etkili olduğu bulundu (Sung ve ark., 2005; Goraca ve ark., 2009).

LA'nın diyabetik kardiyomiyopati hastalığındaki mitokondriyal MDA, GSH ve manganaz süperoksit dizmutaz enzim aktivitelerini koruduğu, kardiyak fonksiyonlardaki kötüleşmeyi geciktirdiği; diyabetik kalpteki yapısal bozuklukları tersine çevirdiği ve sonuç olarak diyabetik kardiyomiyopati gelişimine karşı koruyucu rol oynayabileceği bildirildi. Artwohl ve ark. (2007) özellikle geç diyabetik vasküler komplikasyonlarda görülen endotelial disfonksiyonuna ALA'nın yararlı etkileri olabileceğini gösterdiler (Li ve ark., 2008).

ALA'nın, obez ratların endotelial fonksiyonları üzerine yapılan bir çalışmada, AMP ile aktifleşmiş olan protein kinazı (AMPK) aktifleştirdiği; böylece ALA'nın, endotelial hücrelerdeki aktif AMPK sayesinde obez ratlardaki endotelial disfonksiyon gelişimini önlediği gösterildi. Deneysel hiperkolesterolemi oluşturulan tavşanlarla yapılan bir çalışmada, aortanın histomorfometrik intimal lezyon analizi

sonucu, ateromatöz plak formasyonunun ALA verilen grupta düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Lee ve ark., 2005; Amom ve ark, 2008).

Smith ve ark. (2008) yaşa bağlı olarak endotelial glutatyon düşüklüğünün vasküler endotelial fonksiyon kaybı için kısmen sorumlu tutulduğu ve ALA'nın glutatyon düzeylerini ve endotelial glutatyondaki değişiklikleri tersine çevirdiği için endotelial disfonksiyon tedavisinde kullanabileceğini savundular.

Solunum Sistemi ve Hastalıkları

Akciğerde, endotoksine bağlı oksidatif strese, ALA'nın koruyucu etkisi olduğu saptandı. Endotoksin olarak lipopolisakkarit verilen ratlarda ROS ürünleri oluştuğu ve ALA verilmesi ile lipid peroksidasyonunun geri döndüğü, H₂O₂ konsantrasyonunun azaldığı ve bronkoalveolar lavaj sıvısındaki serbest sülfidril grublarının düzeyinin arttığı görüldü (Goraca ve Skibska, 2008).

Farelerde oluşturulan deneysel astım modelinde, α - LA'in, hava yolu inflamasyonunu, plazma ekstravazasyonunu ve eosinofilik inflamasyonu azalttığı bulundu. VEGF'nin fazla üretimini, akciğer vasküler permeabilitesini ve plazma eksüdasyonunu arttırdığı; LA verilmesi ile de VEGF ekspresyonunun azaldığı saptandı (Lee ve ark., 2006).

Gastrointestinal Sistem ve Hastalıkları

ALA'nın akut pankreatitli ratlardaki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ALA'nın bu hastalardaki serum amilaz ve lipaz ile pankreatik ağırlık/vücut ağırlığı oranında anlamlı düşüş yaptığı görüldü (Park ve ark., 2005).

Karaciğer rezeksiyonlu hastalara LA verilmesinin, aspartat transferaz ve alanin transferazın serum düzeylerini düşürdüğü saptandı (Dünschede ve ark., 2006).

ALA'nın, gastrik ülserde, nötrofil akümülyasyonunu bastırma, endojenez glutasyonu koruma ve reaktif oksijen jenerasyonunu ve apoptozisi inhibe ederek tedavide etkili olabileceği gösterildi (Karakoyun ve ark., 2009).

Üriner Sistem ve Hastalıkları

ALA'nın, iskemi ve tekrarlayan stimuluslar ile indüklenmiş mesanedeki kontraktıl disfonksiyon tedavisinde kullanılabileceği açıklandı (Lin ve ark., 2008).

Mezengiyal proliferatif glomerulonefrit hastalığında, reaktif oksijen türevleri artış göstermektedir. ALA takviyesinin bu artışı yarı yarıya azalttığı saptandı (Budisavljevic ve ark., 2003).

Akut bilyer duktal ligasyonun renal fonksiyonlar üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ALA'nın kolestaza bağılı oluşan renal disfonksiyonu kısmen önlediği görüldü (Holt ve ark., 1999).

Musküler Sistem ve Hastalıkları

Duchenne musküler distrofi kasları, oksidatif stres artışına ve kalsiyum dengesizliğine maruz kalır ki, nekroz ve apoptozisin her ikisi miyofibril kaybına katkıda bulunmaktadır. Kaslardaki distrofik paterni düzeltmek için serbest radikal toplayıcıları ile tedavinin mümkün olup olmadığını araştıran bir çalışmada ALA'nın, plazmatik kreatin klerensini düşürdüğü, fare diyafragmasındaki lipit peroksidasyon ürünlerini ve antioksidan enzim aktivitesini azalttığı saptandı (Hnia ve ark., 2007).

İskelet kasındaki kontraktıl özellikler üzerine ALA takviyesinin iskelet kas yorgunluğuna etkisinin olmadığı bildirildi (Coombes ve ark., 2001).

Duyu Sistemi ve Hastalıkları

LA'in retinal pigment epitelyum hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin yaşa bağlı artışına karşı etkili olduğu bulundu. İnsan retinal pigment epitelyum hücrelerindeki mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif hasara karşı LA'in nötral amidi olan lipoamid ile LA'in koruyucu etkinliğinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, lipoamidin oksidatif hasardaki retinal pigment epitelyal hücreleri korumada LA'ten daha iyi bir antioksidan olduğu saptandı (Voloboueva ve ark., 2005; Li ve ark., 2008).

Sinir Sistemi ve Hastalıkları

LA ve N-asetil sistein takviyesinin Alzheimer hastalığındaki fibroblastların oksidatif ve apoptotik markırlarını koruduğu saptandı. Bu yüzden ALA ve N-asetil sisteinin birlikte kullanımının bu hastalıkta umut verici olabileceği düşünüldü (Moreira ve Ark., 2007).

ALA, multipl skleroz'da relaps sıklığını ve semptomların şiddetini azalttığı görüldü. Aynı zamanda doza bağlı olarak serum inflamatuvar indikatörleri anlamlı ölçüde azaldığı saptandı. Multipl skleroz'un hayvan modellerinde, ALA'nın anti-inflamatuvar etkisinin olduğu gösterildi (Kidd, 2005).

Diyabet

Diyabetes mellitus, oksidatif stresin artması ile ilişkilidir. Bu artış, ya serbest radikal üretiminin artmasına ya da antioksidan savunmasındaki azalmaya bağlı olabilir. Diyabetik komplikasyonların etiolojisinde, oksidatif stresin önemli rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt vardır. Hiperglisemi ile ilişkili birçok biyokimyasal yol (protein glikozilasyon, polyol yolu, glikoz otooksidasyonu) serbest radikal oluşumuna yol açar. Oksidatif stres, yalnızca diyabet komplikasyonları ile değil aynı zamanda insülin rezistansı ile de ilgilidir. İn vitro olarak oksidatif stres, çeşitli düzeylerde insülin rezistansına yol açar. Oksidatif stres, β hücrelerini etkiler ve bu hücrelerin mitokondrileri etkilenir. Kaldı ki β hücrelerinin antioksidan düzeyleri düşüktür. Oksidatif stresin artmasına bağlı olarak ortaya çıkan negatif fizyolojik

sonuçların ışığında Tip 2 diyabetin tedavisinde antioksidan kullanımını destekleyen kanıtlar giderek artmakta ve klinik olarak kabul görmeğe başlamaktadır. ALA'nın insülin rezistansından koruyucu etkinliği, oksidatif stresin artışıını önlediği içindir (Evans, 2000; Midaoui ve Champlai, 2002).

İnsülin reseptörleri, vücutta serbest radikal aktivite düzeyi yükseldiği zaman iyi çalışmamakta iken LA bu problemi düzeltmektedir. Ayrıca LA, arterlerde plakların oluşumu ve yüksek kan şekeri düzeyine bağlı diyabetik komplikasyonları geri döndürebilmekte ve önlemeye yardım etmektedir (Al ghaflı ve ark. 2004).

Diyabetik ratlardaki vasküler duvar ve oksidatif strese karşı LA etkisinin araştırıldığı çalışmada, ALA verilen ratlarda kan şekeri ve HbA1c seviyelerinin ALA verilmeyen gruba göre anlamlı ölçüde düşük bulunduğ; diyabetik ratlarda görülen dislipidemiği iyileştirdiği, plazma superoksit dizmutaz enzim aktivitesi ve vitamin C seviyesini arttırdığı, periferik lenfositlerdeki oksidatif DNA hasarının düzeylerini anlamlı ölçüde düşürdüğü ve plazma ile aortada yükselmiş MDA aktivitesini inhibe ettiği, vasküler morfolojideki değişiklikleri azalttığı saptandı (Budın ve ark, 2009).

Tip 2 diyabetli hastalara çeşitli dozlarda ALA verilmesinin, bu dozlar arasında anlamlı farklar gözlenmemesine rağmen ALA alan hastalarda, insülin ile uyarılmış glikoz atılımında plaseboya göre anlamlı iyileşmeler olduğu tespit edildi. Bu, ALA'nın oral alımının Tip 2 diyabetiklerde insülin sensitivitesini iyileştirmede etkili olabileceğinden kaynaklıdır. Tip 2 diyabetli olup diyetle veya diyetle birlikte antihiperглиsemik ilaçlar kullanılarak kan şekeri kontrol altına alınan hastalarda, LA'nın intravenöz yoldan verilmesi, insülin sensitivitesini arttırarak metabolik yoldan faydalı olduğu görüldü. Ancak oral alımının uzun süreli ve yüksek doz verilmesinin minimal etkisi olduğu saptandı. Bunun sebebi, oral LA alımının terapötik düzeylerinin muhtemelen kısa süreli olmasındandır. Bunun da sebebi, LA'nın kısa yarı ömrü ve yaygın presistemik eliminasyonudur. Oral LA alımından sonra plazma LA konsantrasyonu, maksimum düzeyine hızlı ulaşır; ancak insülin sensitivitesi ve glukoz kontrolünü etkilemeye yetmeyecek seviyelere düşer.

İntravenöz olarak verilen LA ise daha yüksek plazma düzeyine ulaşır ve bunu daha uzun süre korur. α - LA'in intravenöz verilmesi ağırlı diyabetik nöropatide kısa vadede klinik olarak anlamlı iyileşmeye yol açar. Dolayısıyla Mijnhout ve ark. (2010) α - LA'in intravenöz verilmesini önermekte iken oral uygulamalara ilişkin yararının kesin olmadığını saptadılar. Başka bir araştırmada da intravenöz LA verilmesinin etkili olduğu ancak oral alımının diyabetik nöropatinin semptomlarını tedavi etmek için daha az etkili olduğu görüldü. ALADIN III çalışmasında semptomatik polinöropartisi olan Tip 2 diyabetli hastalarda ALA verilmesinin, intravenöz ve oral verilen gruplar arasında subjektif semptom değerlendirilmesinde anlamlı farklılıklar oluşturmadığı, ALA tedavisinin sinir fonksiyonlarında iyileşmede ise olumlu etkisinin olduğu saptandı (Jacob ve ark., 1999; Evans ve Goldfine, 2000; Ziegler ve ark., 2009).

ALA, insülin rezistansı oluşturulan hücrelerdeki glukoz alımını uyarabilir. ALA, iskelet kası gibi dokulardaki mevcut şeker durumunu onarabilir. Tip 2 diyabetiklerde, ALA verilmesinin, insülin sensitivitesini arttırdığı ve serum laktat/pirüvat'a bağlı hiperglisemiyi önlediği görüldü (Khanna ve ark., 1999b; Konrad ve ark., 1999).

Deneyisel araştırmalar, R-ALA'nın, S-ALA'ya göre insülin duyarlılığını attırmada daha etkili olduğunu göstermektedir. Non-diyabetik insülin rezistansın oluşturulduğu bir hayvan modelinde R-ALA, obez ratların iskelet kasları tarafından glikoz alımını %65 oranında arttırdığı, S-ALA ise %29 oranında arttırdığı görülmüştür. Ayrıca R-ALA, plazma insülinini %17 oranında anlamlı ölçüde azalttığı; fakat S-ALA insülin düzeylerini %15 oranında arttırdığı saptandı. Bu, S-ALA ile birlikte olan insülin direncinde bir artışa işaret edebilir (Streeper ve ark., 1997).

Diyabetik nefropati, terminal böbrek yetmezliğinin önde gelen bir sebebidir. Hiperglisemi, diyabetik nefropatinin oluşması ve ilerlemesinde aracılık eden önemli bir faktördür. Ancak renal komplikasyonu olan diyabetik hastalar, insülin tedavisi

almasına rağmen artan sıklıkta diyabetik renal hastalığına tutulmaktadır. Hipergliseminin yan etkilerini açıklayan mekanizmalar arasında oksidatif stres de sayılmaktadır. Bir hayvan çalışmasında, ALA'nın erken diyabetik glomerular hasarı önlemede etkili olabileceği ve yüksek doz C ve E vitaminlerinden daha fazla koruma sağlayabileceği ileri sürüldü. Bu çalışmada ALA'nın, üriner albümin atılımının artışı, fraksiyonel albümin klerensini ya önlediği ya da anlamlı derecede azalttığı ve aynı zamanda glomerul hacmini kontrol grubundaki hacime yaklaştırdığı görüldü (Koya, 2003; Melhem ve ark., 2001).

Katarakt

Katarakt gözün lens kısmında antioksidan aktivitenin azalmasıyla birlikte oluşur ve lensin en önemli oksidantı olan glutatyon, LA tarafından rejenere edilmektedir (Karaca, 2007).

Aldoz redüktaz enzimi, diyabette katarakt gelişiminde önemli bir rol oynar. LA, rat lensindeki aldoz redüktaz aktivitesini inhibe eder. Bir hayvan çalışmasında ALA, deneysel katarakt formasyonunu inhibe ettiği görüldü. ALA verilmesi, lensteki glutatyon, askorbik asit ve alfa tokoferol ile glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve askorbat redüktaz aktivitesinin arttığı saptandı. LA verilmesinin, verilmeyen gruba göre yüksek glukoz düzeyini düşürdüğü ve lens opasifikasyonunu anlamlı ölçüde azalttığı görüldü (Ou ve ark., 1996; Maitra ve ark., 1995; Bilka ve Wlodek, 2005).

Glokom

Glokomlu hastalar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, glutatyon düzeylerini yansıtan sülfidril gruplarının düzeyi, özellikle hastalığın ileri evrelerinde olmak üzere, humor aközlerinde anlamlı derecede azaldığı bulundu. Aynı şekilde eritrosit glutatyon düzeyi de bu hastalarda azalmaktadır. Glokomlu hastaların ön kamaralarında MDA düzeyleri normalden iki kat arttığı saptandı. LA verilmesinin, azalmış olan glutatyon düzeyini arttırabileceği, bunun da glokom tedavisinde faydalı olabileceği sonucuna varıldı. Açık açılı glokomu olan deneklere LA verilmesinin,

glokomun biyokimyasal parametrelerini ve görme fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirildi. (Head, 2001;Filina ve ark., 1995).

İskemi – Reperfüzyon Hasarı

Bir doku alanı, bir süre için kandan yoksun bırakıldıktan sonra (örneğin beyinde inme sonrasında veya kalpte pıhtı çözünmesi sonrası olduğu gibi) doku reperfüzyonu, serbest radikal oluşumunda bir patlamaya yol açar. Bir hipoksi periyodundan sonra dokuların ani reoksijenizasyonu (reperfüzyon), inme, kardiyovasküler arrest, hemoraji veya kafa travmasına bağlı beyin hasarına sebep olur. İskemi – reperfüzyona maruz bırakılan hayvanlarda LA verilmesi, reperfüzyonun etkilerini azaltmış diğer bir deyişle kontrol grubuna göre beyin hücrelerindeki ROS düzeyinin azaldığı, hasar boyutlarının küçüldüğü ve hayvanların sağ kalım süresinin uzadığı saptandı. Reperfüzyon hasarının önlenmesinde, DHLA'nın etkinliği gösterildi (Bilska ve Wlodek, 2005; Monograph, 2006).

İskemi - reperfüzyona bağlı oluşan renal disfonksiyona karşı ALA etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iskemiden önce ve hemen sonra verilen ALA'nın, böbrekte iskemi - reperfüzyona bağlı hasardan koruduğu (renal hemodinamiklerin, üriner konsantrasyonun, sodyum ekskresyonunun normalleştirilmesi) görüldü (Bae ve ark., 2008).

Mantar Zehirlenmesi

Amanita mantar zehirlenmesinde, hemen tanı konulmasının; zorunlu ve agresif tedavi yapılmasının temel amacı, iyileşmeye hızla başlama zorunluluğudur. Hemoperfüzyon ve tioktik asit (LA) içeren kombine terapinin, amanita virosa mantarı teşhisi konulan iki olgudaki tedavisini başarıyla gerçekleştirdi (Plering ve Bratanow, 1990).

Ağır Metal Toksisitesi

Ağır metaller için ideal şelatör maddede aranan özellikler; kolayca hücreye girebilmeli, proteinlerle oluşturduğu kompleks içinde iken bile ağır metallerle

şelasyon yapabilmeli ve diğer organ ve dokulara dağılmadan metalin atılımını arttırmalıdır. ALA'nın bu kriterlerden ikisini (hücre içine girme ve diğer sülfidril proteinlerine bağlı metallere kompleks oluşturma) karşılamaktadır (Patrick, 2002).

Eksojen olarak alınan ALA, dolaşımında serbest olarak bulunur ve dolaşımında bulunan ağır metalleri yakalayabilir ve metal toksisitesine bağlı hasarı önleyebilir. ALA'nın kan-beyin bariyerine geçmesi önemlidir. Çünkü civa ve kurşun beyinde glia hücrelerinde birikir (Patrick, 2002). Kurşun toksisitesini araştıran hayvan çalışmalarında, LA'nın direkt şelasyon yapan etkisinin olmadığı görüldü. Ancak hepatik ve renal glutatyon ile oksidatif stres markırları üzerine kurşunun etkilerini azalttığı bulundu. Kurşun ile muamele edilen hücrelerde LA, oksidatif stresi azaltıp, hücre sağ kalım hızını artırır (Patrick, 2002 ve 2006).

ALA ve DHLA'nın manganez, çinko, kadmiyum, kurşun, kobalt, nikel ve demir iyonları ile kompleks oluşturduğu gösterildi. ALA'nın ağır metallere bağlanması, serbest radikallerin doku hasarı ve enzim inaktivasyonuna yol açmasını önlemektedir. ALA, Wilson hastalığında kullanılarak renal bakır atılımını arttırdığı ve karaciğer fonksiyonlarını normale döndürdüğü saptandı. ALA, demire bağlı protein ile veya vitamin C'nin yerini alarak Fe^{+2} 'ye bağlanabilir. DHLA, ferritin molekülünden demirin serbestleşmesini kolaylaştırabilir ve demiri bağlayabilir. Demir, beyinde özellikle substantia nigra ve globus pallidus'ta fazla miktarda bulunur. Bu fazlalık ve doymamış yağ asitlerinin artmış olması, doku peroksidasyonunun artmasına neden olur. ALA'nın substantia nigra ve diğer santral sinir sistemi kısımlarındaki demir ile ilişkili reaksiyonların oluşturduğu serbest radikalleri baskıladığı bulundu. Kadmiyum, arsenik ve civa da benzer yollarla hücre hasarına yol açarlar (mitokondriyal hasar, mitokondriyal enzimlerin inhibisyonu, protein sentezinin baskılanması ve serbest radikallerin oluşması gibi). Bu üç metal sülfidril içeren ligantlara (glutatyon, ALA vb.) yüksek afinite gösterir ve her biri redükte glutatyon düzeylerini azaltır. LA, hücrel glutatyon düzeyini artırır ve civanın mobilizasyon ve atılımını destekler. Böylece hücrel hasar ve nörotoksisiteyi azaltır. DHLA'nın doğrudan ağır metal bağlayıcı etkileri de vardır (Patrick, 2002).

Aids

ALA, NF- κ B'nin etkisini azaltır. NF- κ B inflamatuvar yanıttan sorumlu olan proteinlerin gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Aynı zamanda HIV virüsünün replikasyonuna katkıda bulunmaktadır. NF- κ B'nin DNA bağlayıcı aktivitesi DHLA tarafından arttırılırken α -LA tarafından azaltılmaktadır. LA, HIV-1 de dahil olmak üzere DNA'ya direkt olarak bağlanan diğer virüslerin replikasyonunu engellemektedir. LA verilen AIDS'li hastaların glutatyon, Vitamin C ve Yardımcı T hücre düzeyleri artarken oksidatif stres kalıntılarının azaldığı tespit edildi (Packer ve ark., 1995).

Egzersiz ve Spora Bağlı Durumlar

Egzersiz sırasında oksidatif stres artar ve kan glutatyon oksidasyonu bu stresin markırıdır. Glutatyon eksikliği olan hayvan çalışmalarında egzersize bağlı oluşan oksidatif stresten korumak için yeterli doku glutatyonun bulunması gereklidir (Sen ve Packer, 2000).

Egzersiz yüklemesi ile kalpteki glutatyon-s-transferaz aktivitesindeki düşüş, LA takviyesi ile korunmaktadır. LA takviyesinin kaslardaki oksidatif lipit hasarına karşı koruyucu olduğu tespit edildi. Musküler hasara maruz kalan erkek bireylerdeki ALA kullanımının oksidatif hasarı azalttığı, antremansız ile antremanlı gruplar arasındaki glutatyon antioksidan sistemdeki farklılıkları ortadan kaldırdığı saptandı (Khanna ve ark.,1999a; Zembron-lacny ve ark., 2009).

Diğer Endikasyonlar

LA'nın felç ve miyokard infarktüste, dokuları oksijen azlığına bağlı hasardan koruduğu gösterildi. LA aynı zamanda kanser oluşturabilecek genetik programa sahip hücreleri durdurma potansiyeline sahip olup kanser gelişim hızını azaltan bir rol oynayabilmektedir (Karaca, 2007).

Retinitis pigmentosa hastalığına karşı verilen ve içinde ALA'nın da olduğu antioksidan karışımının, bu hastalıktaki oksidatif hasara bağlı oluşan rod hücre

ölümünden sonra görülen koni hücrelerinin aşamalı ölümü hipotezine karşı koruyuculuk gösterdiği bulundu (Komeima ve ark., 2006).

Ataksi telenjektazide ALA verilmesinin, hastalığa bağlı kronik aktivasyondaki reaktif oksijen radikalleri ile ilişkili olan protein düzeylerinde önemli oranda düşüş gösterdiği saptandı (Gatei ve ark., 2001).

Metabolik sendrom, anjiotensin 2 aktivitesini arttırırken; proinflamatuvar ve oksidatif düzey ile endotelial disfonksiyonu indüklemektedir. Metabolik sendromlu hastalara irbesartan ve/veya LA verilmesi aterosklerozun patogenezinde var olan faktörleri ve proinflamatuvar markırları azalttığı ve endotelial fonksiyonları iyileştirdiği tespit edildi (Sola ve ark., 2005).

İnsülin otoimmün sendrom, hipoglisemi ve öncesinde insülin alımı olmaksızın insüline karşı otoantikörlerle karakterize nadir görülen bir hastalıktır. ALA ile İnsülin otoimmün sendromunun gelişmesinde bağlantı olabilme ihtimalinden, ALA'nın daha dikkatli kullanılması gerekmektedir. Düzensiz bir şekilde 2 ay boyunca 200 mg/gün ALA alan 32 yaşında bir kadında da insülin otoimmün sendrom tanısı konuldu (Takeuchi ve ark., 2007; Ishida ve ark., 2007).

Transient fokal iskemik fare modelinde, LA tedavisinin felçli infarkt hacminde anlamlı ölçüde düşüş yaptığı saptandı (Clark ve ark., 2001).

Kronik yorgunluk sendromunun patogenezinde, oksidatif stresin de rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Dolayısıyla α - LA'in de aralarında bulunduğu çeşitli antioksidanların tedavide kullanılması gündemdedir. Bu antioksidanların ümit verici olduğu ancak kronik yorgunluk sendromu tedavisindeki etkinliklerini gösteren daha fazla klinik çalışmaların gerekli olduğu bildirildi (Logan ve Wong, 2001).

Hepatit C virüsü hepatitine bağlı oluşan siroz tedavisinde, LA verilmesi ile elde edilen sonuçlar, LA'nın büyüme faktörü ya da büyüme faktörü stimlanı olarak işlev gördüğünü desteklemektedir (Bilska ve Wlodek, 2005).

Radyasyondan koruyucu olarak antioksidanların etkileri araştırıldığında; aralarında ALA'nın da bulunduğu 5 antioksidandan oluşan karışım diyetinin ratlardaki kemik iliği supresyonunu anlamlı ölçüde azalttığı ve hayvanların sağ kalımını arttırdığı saptandı (Wambi ve ark., 2008).

LA'nın yaş ile ilişkili olan mitokondriyal fonksiyonlarda azalmayı ve oksidatif stresteki artışı kısmen geri döndürebilmektedir. LA tedavisi yaşa bağlı glutatyondaki azalmayı ve lipit peroksidasyondaki artışı da azalttığı görüldü (Evans ve Goldfine, 2000).

1.1.8. Dozaj

LA, sağlığın korunması, yaşlanmanın etkilerini yavaşlatması ve en uygun antioksidan etkiyi gösterebilmesi için 100-200 mg./gün alınmalı, diyabet, hepatitler ve ağır metal zehirlenmelerinde 300-600 mg./gün kullanılmalıdır (Bustamante ve ark., 1998).

1.1.9. Yan Etkiler ve Toksikite

Deri reaksiyonları ve bulantı-kusma gibi gastrointestinal semptomlar, i.v infyon ile 1200 mg ve daha yüksek dozda kullananların küçük bir yüzdesinde gözlenmiştir (Karaca, 2007).

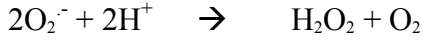
1.2.Antioksidanlar

Antioksidan enzimlerin başlıcaları, Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)'dir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Süperoksit dismutaz

Aslında tek bir enzim değil, bir enzim grubudur. Bu enzim grubu, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizlemektedir.

Bu enzim grubunun katalizlediği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir;



Süperoksit dismutaz, metalloenzim grubundan sayılmaktadır. Bunun nedeni yapısında metal bulunmasıdır. Bu enzimin insanda var olan iki farklı tipi olan Cu-Zn SOD ve Mn-SOD ilk defa McCord ve Fridovic tarafından 1969 yılında ortaya çıkarılmıştır. Bu enzim grubunun ökaryot canlılarda, canlıda bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösteren üç farklı izoformu tespit edilmiştir. Eğer enzim ekstrasellüler alanda bulunuyorsa ekstrasellüler SOD, sitoplazma içerisinde bulunuyorsa sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondride bulunuyorsa mitokondrial SOD (Mn-SOD)'dur (Fan ve ark., 1999). Hücrenin sitoplazmasında bulunan Cu,Zn-SOD'un molekül ağırlığı 32.000 daltondur. İki alt ünitesi bulunan bu SOD izoformunun bir ünitesinde Cu atomu, diğer ünitesinde ise Zn atomu bulunmaktadır. Hücrenin mitokondrisi içinde bulunan Mn-SOD ise 23.000 dalton ağırlığındadır ve iki alt biriminden her birisi bir Mn atomu içermektedir. Bu birimlerdeki Mangan atomları +3 değerliklidir. Enzimin bu izoformu prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk olarak Keele ve ark. tarafından izole edilmiştir (McCord ve Fridowich, 1969; Keele ve ark., 1970).

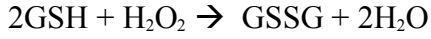
Glutasyon peroksidaz

Bu enzim ilk defa 1981 yılında Siddons ve Mills (1981) tarafından memeli eritrositlerinde gösterilmiştir. Bu enzim de, bir metal olan selenyumu yapısında

bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Bu enzim, redükte glutatyonun okside glutatyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir.

Redükte glutatyon (GSH)'un okside glutatyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda GSHPx enzimi hidrojen peroksiti suya indirger. Daha sonra glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon tekrar redükte hale dönüştürülebilir.

Reaksiyon şu şekildedir ;



GSHPx, hidrojen peroksitin özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda CATenzimine oranla daha etkilidir.

Aynı zamanda bu enzim, lipid peroksitlerinin indirgenmesini de katalizlemektedir (Halliwell, 1974 ve 1994).

Glutatyon redüktaz

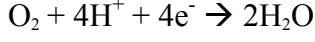
Okside haldeki glutatyonun, indirgenmiş glutatyona dönüşümünü katalizler. Böylece, redükte glutatyon kullanan antioksidan enzimlerin redükte glutatyon ihtiyacını karşılayarak indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir.

Glutatyon-S-transferaz

Bu grup enzimlerin, ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda aktif rolleri vardır. Bu enzimler de aynen GSHPx enziminin yaptığı gibi lipid peroksitlerini redükte ederek antioksidan etki gösterirler. GSH-Px enzimi aktivite gösterebilmek için selenyuma ihtiyaç duyarken, bu enzim selenyumdan bağımsız olarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir (Akkuş ve Gürbilek, 1995).

Mitokondrial sitokrom oksidaz

Süperoksit radikali in vivo olarak başlıca mikrozomal ve mitokondrial elektron transport sistemlerinde üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport sisteminde normal şartlarda bir O₂ molekülüne 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur:



Sitokrom oksidaz, bu elektronlanmış oksijen moleküllerini kendi aktif merkezinde sıkıca tutarak bu elektronların ortama sızmasını engeller. Elektron sızıntısını önleyerek ortamdaki diğer moleküllerin oksidasyona uğramasına engel olmasından dolayı antioksidan etkisi vardır denilmektedir.

1.3. Sinir Sistemine Genel Bakış

Sinir sisteminde nöron adı verilen sinir hücreleri ile glia hücreleri adı verilen destek hücreleri olmak üzere iki tip hücre vardır. Nöronlar duyuların algılanması, motor ve emosyonel cevapların oluşturulması, öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan hücrelerdir. Bu hücrelerin uyarılabilme özelliği vardır.

Tipik bir nöronun dört kısmı vardır

- Hücre gövdesi (corpus neurale=soma)
- Akson (axon)
- Dendritler (dendritum)
- Sinaptik terminaller (presinaptik terminaller).

Hücre gövdesinin dendrit ve akson olmak üzere iki tip uzantısı vardır. Nöronlarda genellikle birden çok dendrit ve bir tane akson bulunur. Dendritler dallanarak diğer nöronların uzantıları ile bağlantı kurar ve bu nöronlardan gelen impulsların hücre gövdesine iletilmesini sağlar. Akson ise, genellikle dendritlere göre daha uzun olup, hücre gövdesinden gelen impulsların diğer nöronlara veya efektör organlara iletilmesini sağlar. Aksonların bir kısmı santral sinir sisteminin dışına

çıkarak periferik sinirleri (nervus) oluşturur. Nöronlar fonksiyonel olarak motor nöronlar, duyu nöronları ve internöronlar olarak sınıflandırılır. Motor nöronlar periferik yapıların, organların ve sistemlerin çalışmasını santral sinir sisteminden gelen impulslar doğrultusunda, aktive veya inhibe ederek düzenler. Bu nöronların aksonları, periferik sinir sisteminin efferent bölümünü oluşturur. Motor nöronlar, somatik motor nöronlar ve visseral motor nöronlar olmak üzere iki grupta incelenebilir. Somatik motor nöronlar iskelet kaslarını innerve eder. Somatik motor nöronlar alpha (α), beta (β) ve gamma (γ) olmak üzere üç tiptir. Alpha motor nöronlar extrafusul kas liflerini, beta motor nöronlar intrafusul kas liflerini, gamma motor nöronlar ise hem extrafusul hem de intrafusul kas liflerini innerve eder (Taner, 2005).

1.3.1. Sinir Sisteminin Bölümleri

Sinir sistemi morfolojik olarak bir bütün halinde olmasına rağmen, bazı anatomik ve fonksiyonel alt bölümlere ayrılarak incelenir. Bu amaçla sinir sistemi anatomik olarak santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölümde incelenir. Sinir sistemi ayrıca fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere iki bölüme ayrılır (Taner, 2005).

Santral (merkezi) sinir sistemi vücut içinden ya da dışından alınarak afferent sinirlerle getirilen uyarıları alan, değerlendiren ve gerekli emirleri ilgili dokulara ya da organlara efferent sinirlerle gönderen sinir sistemi bölümüdür (Gökmen, 2003).

Santral sinir sistemini oluşturan yapılar kranialden kaudale doğru şu şekilde sıralanır:

- Prosencephalon (forebrain)
- Telencephalon (beyin hemisferleri)
- Diencephalon (epithalamus, thalamus, hypothalamus, subthalamus)
- Mesencephalon (midbrain)

- Rhombencephalon (hindbrain)
 - Metencephalon (pons ve cerebellum)
 - Myelencephalon (medulla oblongata)
- Medulla spinalis

1.3.1.1. Periferik Sinir Sistemi

Periferik sinir sistemi, santral sinir sisteminin dışına çıkan aksonların oluşturduğu periferik sinirler ile santral sinir sisteminin dışında nöronların toplu olarak bulunduğu ganglion adı verilen yapılar oluşturur. Medulla spinalis'ten çıkan otuz bir çift spinal sinir ile beyin ve beyin sakından çıkan on iki çift kranial sinir ve bunların dalları periferik sinirleri oluşturur (Taner, 2005).

Periferik sinir sistemi değişik vücut dokularından alınan uyarıları merkezi sinir sistemine (afferent, duyuşal) ya da buradan aldığı emirleri sonuç organlara (efferent, motor) iletmekten sorumlu sinir liflerini içerir. Motor lifler çizgili kas dokusunun kasılmasını sağlayan somatik sinir sistemi; düz kas ve kalp kasının kasılması ile bezlerin sekresyonunu sağlayan otonom sinir sistemi bölümlerine ayrılır. Somatik sinir sistemi spinal ve kranial; otonom sinir sistemi ise sempatik ve parasempatik sinir liflerince oluşturulur (Gökmen, 2003).

Periferik sinir sisteminde her iki aksonu en dıştan endoneurium adı verilen ve bağ dokusundan oluşan bir yapı sarar. Yine bağ dokusundan oluşan perineurium genellikle birkaç yüz aksonu bir arada sararak fasciculus (sinir demeti)'ları oluşturur. Birkaç fasciculus'un bir araya gelmesi ile periferik sinir oluşur. Bir periferik siniri en dıştan saran ve bağ dokusundan oluşan yapıya ise epineurium adı verilir (Taner, 2005).

kranial sinirlerde görülür. Miyelinsiz lifler ise, özellikle otonom sisteminde preganglionik lifler olarak bulunur (Taner, 2005; Arıncı ve Elhan, 2001).

Periferik sinirin bir parçası olan spinal sinirler 31 çift olup 33 medulla spinalis segmentinden çıkar. Bu spinal sinirlerin bölgelere göre dağılımı,

8 adet nevi cervicales

12 adet nervi thoracici

5 adet nervi lumbales

5 adet nervi sacrales

1 adet nervus coccygeus (Arıncı ve Elhan, 2001).

Spinal sinirler medulla spinalise ön ve arka kökler aracılığı ile bağlanırlar. Kökleri oluşturan liflere fila radicularia denilir. Bu köklerden önde bulunanına radix anterior, arkada bulunanına radix posterior denilir. Ayrıca ön kökler motor lifler bulunması nedeniyle radix motoria, arka köklere de sensitif liflerin bulunması nedeniyle radix sensoria de denilmektedir.

Ön ve arka kökler ganglion spinalenin hemen dışında birleşerek spinal siniri (truncus nervi spinalis) oluştururlar ve foramen intervertebrale'den geçip, vertebral kanalı terkederler. Kökler, pia mater ve arachnoidea mater spinalis'in uzantıları tarafından sarılmıştır ve bu zarlar spinal sinirin dura mater spinalis'i deldiği yere kadar uzanırlar. Spinal siniri oluşturan her bir kök, dura mater spinalis'i ayrı ayrı deler (Arıncı ve Elhan, 2001).

1.3.1.2. Plexus Sacralis

Pelvis boşluğunda ve sacrum'un her iki ön-yan tarafında bulunan plexus sacralis, truncus lumbosacralis (4. lumbal sinirin küçük bir bölümü ile 5. lumbal sinirin tümünün birleşmesinden oluşur) 1.,2.,3. sakral spinal sinirlerin ön dalları ve 4. sakral sinirin küçük bir bölümünün katılmasıyla oluşur. Üçgen şeklinde olan plexus sacralis'in tabanı sacrum'a, tepesi de foramen ischiadicum majus'a doğru

yönelmiştir. Nervus ischiadicus da bu üçgenin tepesinden aşağı doğru plexus sacralis'in bir devamı şeklinde uzanır (Arıncı ve Elhan, 2001).

Plexus sacralis'in dalları

- 1- N. mm. quadrati femoris (L4,5,S1)
- 2- N.mm. obtratorii interni (L5,S1,2)
- 3- N. mm. piriformis (S1,2)
- 4- N. gluteus superior (L4,5,S1)
- 5- N. gluteus inferior (L5, S1,2)
- 6- N. cutaneus femoris posterior (S1,2,3)
- 7- N. ischiadicus
 - N. tiibialis (L4,5,S1,2,3)
 - N. fibularis (peroneus) communis (L4,5,S1,2)
- 8- N. pudendus (S2,3,4) (Arıncı ve Elhan, 2001).

1.3.1.3. Nervus Ischiadicus

Vücutun en kalın siniridir. Ayak derisinin tümü ile bacak derisinin büyük kısmına sensitif dallar, uyluğun arka tarafındaki kaslar ile bacak ve ayağın tüm kaslarına somatomotor lifler gönderir. Plexus sacralis'in devamı şeklinde olan n. ischiadicus, pelvis'i foramen infrapiriforme'den terkeder.; m. piriformis'in alt kenarından uyluğun alt 1/3'üne kadar uzanır, burada uç dalları olan n. tibialis ile n. fibularis (peroneus) communis'e ayrılır. N. tibialis daha kalın olup n. ischiadicus'un devamı şeklinde görülür. N. ischiadicus gluteal bölgede m. gemellus superior, m. gemeellus inferior, m. obtrator internus ve m. quadratus femoris'in arkasında, m. gluteus maximus'un ön tarafında bulunur. Burada n. cutaneus femoris posterior ve a. glutea inferior ile birlikte syreder. Uylukta m. adductor magnus'un arkasında ve m. biceps femoris'in önünde bulunur. M. biceps femoris'in uzun başı, siniri yukarıdan aşağıya ve içten dışa doğru arkadan çarprazlar. Plexus sacralis'in arka bölüm liflerinden n. fibularis communis, ön bölüm liflerinden ise n. tibialis oluşur. Bu iki sinir birlikte, n.

ischiadicus adı altında fossa poplitea yakınına kadar, bir kılıfla sarılı olarak uzanır. Ancak fossa poplitea yakınında birbirinden ayrılırlar (Arıncı ve Elhan, 2001).

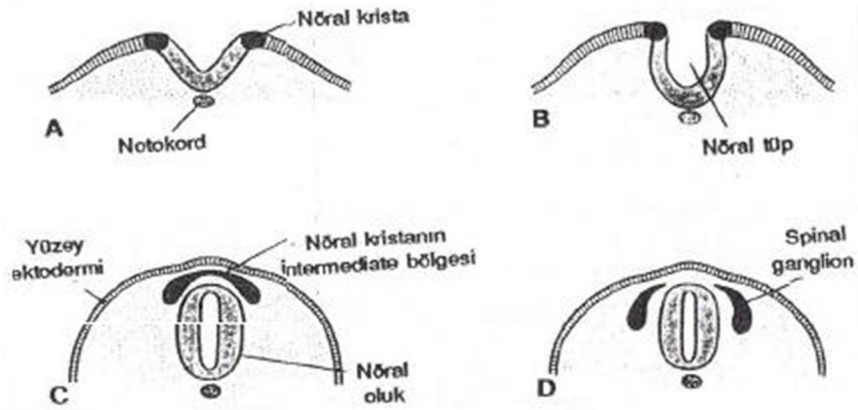
N. ischiadicus'un tam kesisi sık değildir. Olduğunda bacak kullanılamaz hale gelir. Bunun nedeni bacağın fleksiyonu gibi kalçanın ekstansiyonunun da bozulmuş olmasıdır. Bütün bilek ve ayak hareketleri de kaybolur. Tabanca mermisi ya da bıçakla yaralanma sonucu oluşan n. ischiadicus'un tam olmayan kesisine, n. gluteus inferior ve/veya n. cutaneus femoris posterior da katılabilir. Siyatik lezyonun iyileşmesi yavaştır ve genellikle tam olmaz. N. ischiadicus'un konumuna göre kalçanın bir güvenli tarafı (dış taraf) ve bir de tehlikeli tarafı (iç tarafı) vardır. Kalçanın iç tarafının yaralanması ya da buraya yapılan cerrahi girişimler, n. ischiadicus'un ya da uyluğun arka tarafındaki hamstring kaslarına (m. semitendinosus, m. semimembranosus, m. biceps femoris) giden dallarının hasar görmesine neden olur. Bu kasların paralizisi uyluğun ekstansiyonunun ve bacağın fleksiyonunun bozulmasıyla sonuçlanır (Moore, 2007).

N. ischiadicus'un duyuşal liflerinin dağıldığı alanlarda ağrı duyulması haline siyatik denilir. Siyatikte, uyluğun arka yüzünde, bacağın arka ve dış yüzlerinde ve ayağın lateralinde ağrı duyulur. Siyatik, birkaç nedenle oluşabilir. Birincisi intervertebral disklerin prolapsusu sonucu alt lumbal ve sakral spinal sinirlerin bir veya birkaçının ön köklerine basınç yapması sonucu, ikincisi plexus sacralis veya n. ischiadicus'u, pelvis içersindeki bir tümörün sıkıştırması sonucu, üçüncüsü n. ischiadicus veya dallarının inflamasyonu sonucu gelişebilir (Snell, 2004).

Rat siyatik siniri, pelviste ön ve arka dallara ayrılan sakral pleksus (5, 6 ve kısmen 4. lumbal sinirler tarafından oluşturulur)'un arka dalıdır. Siyatik sinir devamında ise nerves tibialis, nerves common peroneales ve kollateral dallara ayrılır (Çınar, 2008).

1.3.2. Sinir Sisteminin Gelişimi

Basit disk şeklinde ve epitel yapısında olan nöral plak, silindir şeklini alarak nöral tüp oluşumunu sağlar. Bu olay nöralasyon olarak bilinir. Nöral tüp, karmaşık sinir sistemine farklılaşır. Nöral tüp oluşumu sırasında nöral plağın özel bir bölgesinden oluşan nöral krest, nöral tüpten ve yüzeyel ektodermden ayrılır. Gelişimin ilerki safhalarında nöral krest, periferik sinir sistemine ait gangliyonları oluşturan nöronları ve diğer bölümlerini meydana getirir. Nöral krest hücreleri nöral tüpten ayrılarak arka kök gangliyon ve kranial gangliyonların duyu nöronlarına ve otonomik gangliyonların sempatik ve parasempatik motor nöronlarına farklılaşır. Arka kök gangliyonda bulunan Schwann hücreleri ve satellit hücreleri de nöral krest hücrelerinden gelişir. Schwann hücreleri, periferik sinir liflerini çevreleyerek miyelin oluşumunu sağlarlar. Satellit hücreleri ise arka kök gangliyonundaki nöron gövdelerini sarar (Kierszenbaum, 2006).

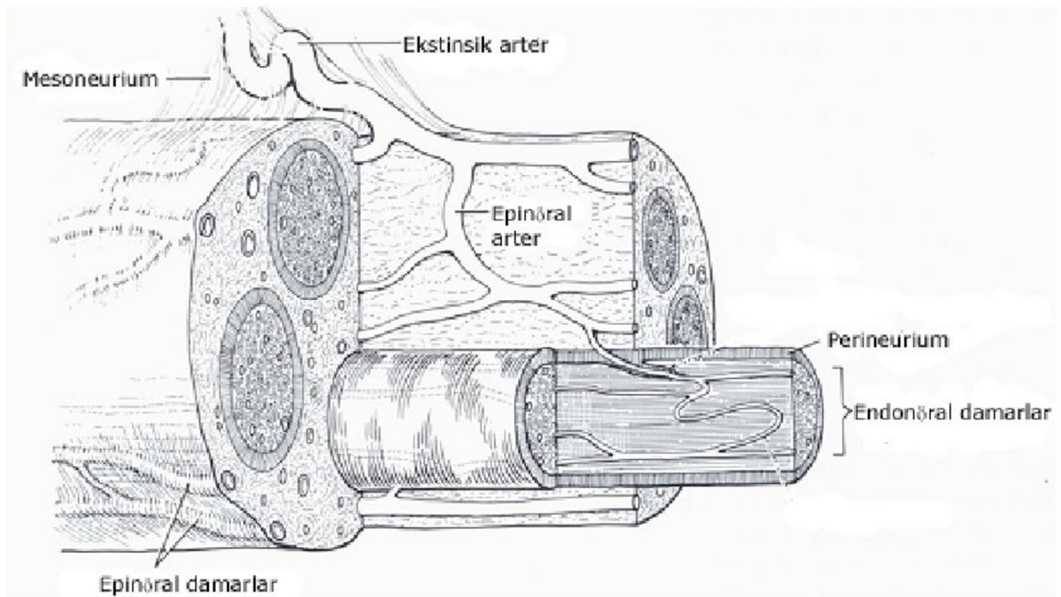


Şekil 1.6: Nöral borunun gelişimi (Sadler, 2005).

1.3.3. Periferik Sinirlerin Kanlanması

Periferik sinir birbirinden bağımsız olan ekstrensek ve intrinsek olarak adlandırılan iki farklı mikrovasküler sistemle beslenmektedir. Ekstrensek sistem, başta bölgesel arter ve venlerden, mükümler ve küçük periosteal vasküler dallardan oluşur ki, büyük sinir dallarına yaklaştıkça sinirin mezonyumunu içinde ilerler. Epinyuma ulaşınca dallara ayrılıp intrinsek sistemle anastomoz yapar. İntrensek sistemde epinöral, perinöral, endonöral ve bunların arasındaki birleştirici damarlardan oluşmaktadır. Epinyum ve perinyumda, siniri uzulmasına kateden besleyici damarlar bulunur. Endonyum seviyesinde ise, sadece ince kapiller ağ mevcuttur (Taylor ve ark., 1994; Best ve Mackinnon, 1991; Low ve Tuck, 1984; Dvali ve Mackinnon, 2003).

Ekstremitte hareketlerine bağılı olarak sinirin uzulmasını, rejyonel damarlar sağlamaktadır ki bu damarları intrinsek ve ekstrensek sistem arasındaki segmental dallar oluştururlar. Sinirlerde, belirgin bir şekilde intrinsek kan akımı vardır. Bu da bir siniri, oldukça uzun mesafeler boyunca besleyebileceği gösterilmiştir. Venöz kan akımı ise arteriollere paralel olarak seyrederek (Thomas ve ark., 1984; Dvali ve Mackinnon, 2003).



Şekil 1.7: Periferik siniri besleyen damarların organizasyonu (Hizay, 2009).

Rat siyatik sinirinin ana kanlanması a. glutealis inferior ve eşlik eden venler sağlamakta olup diğer kaynak ise a. poplitea ve çevresindeki iki popliteal vendir (Green, 1968).

1.3.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Periferik sinir onarım yolunun başarısı ve süresi, sinir yaralanmasının derecesine bağlıdır. Periferik sinir yaralanmaları, etkiledikleri komponentlere göre Seddon ve Sunderland tarafından sınıflandırılmışlardır. Seddon, periferik sinir yaralanmalarını nörapaksi, aksonotomezis ve nörotomezis olarak üçe ayırmıştır:

1) Nörapaksi: Sinirin anatomik bütünlüğü korunduğu ancak fonksiyonunda geçici bir bozukluğun olduğu en hafif yaralanma tipidir. Geçici fonksiyon kaybının nedeni yaralanma bölgesindeki lokal bir iyon-aracılı iletim bloğundan oluştuğu düşünülmektedir. Wallerian dejenerasyon oluşmaz ve fonksiyon tamamen geri döner. Wallerian dejenerasyon kesi noktasının distalindeki aksonların dejenerasyonu olarak tanımlanır.

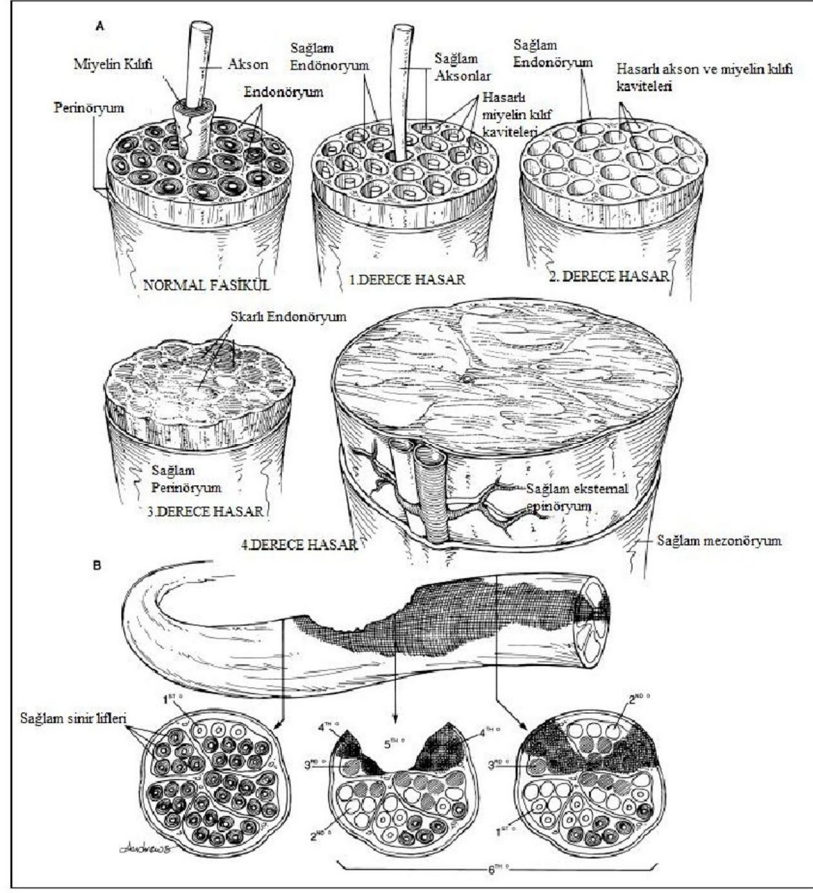
2) Aksonotomezis: Akson ve miyelin kılıfı tamamen kesilmiş olsa da sinirin devamlılığı vardır. Epinöryum ve perinöryum genellikle korunmuştur. Wallerian dejenerasyon gelişse de endonöral tüp sağlam olduğundan spontan rejenerasyon olur (Rummler ve Gupta, 2004; Stacey, 2004; Fernandez ve ark., 1997; Anthony ve Vogel, 1996).

3) Nörotomezis: Sinirin bütünlüğü ve bağlantıları tamamen kesilmiş olup tam bir fonksiyonel kayıp söz kobsudur. Wallerian dejenerasyon olur. Spontan rejenerasyon beklenmez. Cerrahi tedavisi olmadan iyileşme beklenemez (Burnett ve Zager, 2004; Fernandez ve ark., 1997).

Sunderland tarafından periferik sinir yaralanmaları 5 tipe ayrılmış olup, tiplerin işlev, patolojik durum ve prognozları, Seddon sınıflaması ile birlikte aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1.3: Seddon ve Sunderland sınıflamalarına göre sinir yaralanmalarının dereceleri (Varlı, 2005).

Tip		İşlev	Patolojik durum	Prognoz
Nöropraksi	Tip 1	Fokal iletim bloku Motor işlev ve propriyosepsiyon bozuk. Bazı duyuvar ve sempatik işlev korunmuş olabilir.	Kalın liflerde miyelin hasarı Aksonal devamlılık. Walleryan dej.yok	Birkaç hafta veya ay içinde düzelme
Aksonotmezis	Tip 2	Yaralanma yeri ve distalde iletim kaybı	Aksonal ayrılma Walleryan dej. Endo/peri/epinörium sağlam.	Aksonal rejenerasyon gerekli
	Tip 3	Yaralanma yeri ve distalde iletim kaybı	Akson ve endonörium hasarı Peri/epinörium sağlam.	Endonöral ayrılma hemoraji ödem ve skara yol açar. Aksonal yanlış yönlendirme. Prognoz kötü. Cerrahi gerekebilir.
	Tip 4	Yaralanma yeri ve distalde iletim kaybı	Akson, perinörium ve endonörium hasarı Epinörium sağlam	Yol gösterici elamanlarda tam karmaşa. İntranöral skarlanma ve yanlış yönlendirme. Prognoz kötü. Cerrahi gerekebilir.
Nörotmezis	Tip 5	Yaralanma yeri ve distalde iletim kaybı	Tüm sinirin ayrılması	Cerrahi yaklaşım gerekli. Prognoz değişken, kötü.



Şekil 1.8: Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (Akan, 2009).

Sinir Dokusunun Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Nöronlar bölünmezler, bunların dejenerasyonu devamlı kayıp şeklindedir. Santral sinir sisteminde nöronal uzantılar, çok dar sınırlar içinde, perikaryonlarının sentetik aktivitesi yoluyla büyüyerek yenilenebilir. Aynı zamanda periferik sinir lifleri eğer perikaryonları yok olmamışsa rejener olabilirler. Sinir hücrelerinin ölümü perikaryon ve uzantıları ile sınırlıdır. Sadece tek bir bağı olan nöronlar hariç, fonksiyonel olarak ölü bir nörona bağlanmış olan nöronlar ölmezler. Bu son örnekte olduğu gibi, izole nöronlar transnöronal dejenerasyon geçirirler. Sinir hücrelerinin tersine merkezi sinir sisteminin nöroglia, schwann hücreleri ve periferik sinir sisteminin ganglionik satellit hücreleri mitozla bölünebilirler. Merkezi sinir sistemindeki hastalıklar ya da yaralanmalarla oluşan hücre kayıplarındaki boşlukları nöroglia doldurur. Bir sinir aksonundaki dejeneratif değişiklikleri bir onarım fazı takip eder. Yaralanmanın proksimal ya da distal segmentte olması önemlidir. Proksimal segment devamlılığını

perikaryonla sürdürür ve hemen rejenere olur. Sinir hücre gövdesinden ayrılmış distal segment tamamen dejenere olur ve doku makrofajlarca yok edilir (Junqueira ve ark., 1993).

Akson yaralanması perikaryonel değişikliklere neden olur. Bunlar: 1. Kromatolizis; Nissl yapılarının bozulması ve sitoplazmik bazofilinin azalması; 2. Perikaryon hacminde artma; 3. Çekirdeğin perikaryonda periferik pozisyon alması. Yaralanma yerine kısa bir mesafede proksimal segment dejenere olur, ancak ölü kısmın makrofajlarca uzaklaştırılması ile büyüme başlar. Yaralanmanın distalinde, akson ve miyelin kılıf tamamen dejenere olur, artıkları makrofajlarca uzaklaştırılır. Bu gerileyen değişiklikler olurken Schwann hücreleri kalan bağ dokusunda prolifere olur ve hücre sütunlarını oluştururlar. Bu gerileyen değişikliklerden sonra, aksonun proksimal segmenti büyür ve dallanır. Filamanlar Schwann hücre sütunları doğrultusunda ilerler. Schwann hücre sütunlarına penetre olan lifler, büyümeye devam eder ve efektör organa ulaşır. Rejenerasyon, lifler ve Schwann hücre sütunları doğru yerlere yöneldiğinde yeterlidir. Her rejeneratif lif bir kere yapıya orijin verir ve her Schwann hücre sütunu da çeşitli rejeneratif liflerden uzantılar alır. Mikst sinir yaralanmalarında duyu liflerinin rejenerasyonu motor son plaklara bağlı sütunlara doğru gelişirse, kasın fonksiyonu geri gelmez (Junqueira ve ark., 1993).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney hayvanları

Süleyman Demirel Üniversitesi deney hayvan laboratuvarından elde edilen, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 42 adet Sprague-Dawney cinsi erkek rat, çalışmaya alındı. Ratlar, tel kafeslerde 12 saat gece, 12 saat gündüz koşullarında, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Deneyden 12 saat önce, su hariç beslenmeleri durduruldu. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup çalışma süresince etik kurallara uyulmuştur (2009/ Karar: 07).

2.2. Deneysel çalışma yöntemi

Sıçanlar, eşit sayıda (n=7) ve rastgele olarak altı gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol (grup 1), sham (grup 2), I/R (grup 3), I/R + 0.5 ml.%0.9 NaCl (grup 4), I/R + 60 mg/kg ALA (grup 5) ve I/R + 100 mg/kg ALA (grup 6) olacak şekilde düzenlendi. Tüm sıçanlara intramusküler enjeksiyonla 90 mg/kg ketamin (Ketalar 50 mg/ml, 10 ml flakon, Pfizer) ve 10 mg/kg ksilazin (Rompun %2 50 ml, Bayer) uygulanarak genel anestezileri sağlandı.

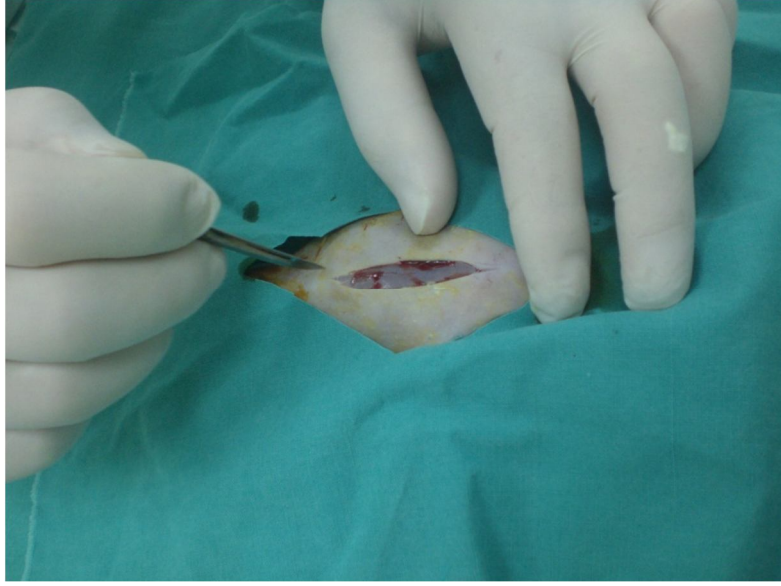
Kontrol grubu (Grup 1): Anestezi sonrası ratlara, bir ısıtma lambası altında sırtüstü pozisyon verildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı ve her iki uyluk bölge mediyal kısımları traşlanıp temizlenerek 18 numaralık bistüri bıçağı ile aynı bölgelere cilt insizyonu yapıldı. Künt diseksiyon yapılarak kaslar ve fasyalar geçilerek siyatik sinire ulaşıldı. Sağ uyluktan rezeke edilen siyatik sinir, biyokimyasal çalışmalar için ependorf tüpüne konuldu. Sol uyluktan alınan siyatik sinir ise histopatolojik incelemeler için %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu içine alındı. Eksize

edilen yerler 4.0 ipek ile suture edilerek kapatıldı. Dokular çıkarılmadan önce tüm ratlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi.



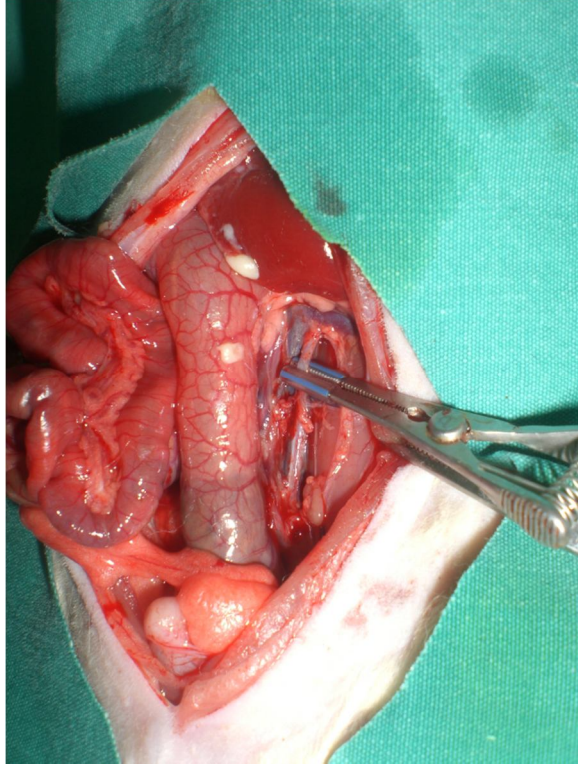
Resim 2.1: Rat siyatik sinirinin rezeksiyon öncesi görünümü.

Sham grubu (Grup 2): Genel anestezi yapılan ratlara abdominal bölge orta hattın laparotomi yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla 10 ml ılık serum fizyolojik, peritoneal boşluğa verildi. Bağırsaklar ıslak gaz ile sola çekilerek abdominal aortaya ulaşıldı. Herhangi bir işlem uygulanmadan aorta abdominalis eksplere edildi ve parmak ile palpe edilip stres uygulandı.



Resim 2.2: Rat abdominal orta hattı üzerinden laparotomi yapıldığı andaki görünümü.

I/R grubu(grup 3): Vena renalis sinistra'nın aorta abdominalis'le kesiştiği yerin distalinden 2 saat süreyle klemp ile iskemi gerçekleştirildi. İnsize edilen yer, serum fizyolojikle ıslatılmış steril spanç ile kapatıldı. 10 dakikalık aralarla ratların vital ve motor fonksiyonları kontrol edildi. İskemi süresinin bitiminde klemp çekilerek 3 saat süreyle reperfüzyon dönemi başlatıldı. İnsizyon yeri 4.0 ipek ile sütüre edildi. Cerrahi işlem süresince hayvanların vücut sıcaklığı ısı kontrollü bir ısıtma masası kullanılarak 36.5 ± 0.5 °C düzeyinde tutuldu. Reperfüzyon döneminde de 10 dakikalık aralarla ratların vital ve motor fonksiyonları kontrol edildi. Reperfüzyon bitiminde ratlar, servikal dislokasyonla sakrifiye edildi ve hedef dokular çıkartıldı. İskemi oluşturulması, klempleme işlemi sırasında distal aortta pulsasyonun kaybolmasıyla, reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrasında distal aortta pulsasyonun geri gelmesiyle değerlendirildi.



Resim 2.3: Rat aorta abdominalise iskemi uygulanan yerin görünümü.

I/R + 0.5 ml. %0.9 NaCl grubu (grup 4): Ratlara, iskemiden 24 ve 1 saat öncesi intraperitoneal 0.5 ml %0.9 NaCl verildi.

I/R + 60 mg/kg ALA grubu (grup 5): 60 mg/kg ALA (T5625-1G, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 50 mg/ml etanol solusyonu içerisinde çözünerek iskemiden 24 ve 1 saat öncesi intraperitoneal 0.5 ml. verildi.

I/R + 100 mg/kg ALA grubu (grup 6): 100 mg/kg ALA verildi.

2.3.Histopatolojik inceleme

Çıkarılan dokular 72 saat %10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Doku fiksasyonu, Tablo-4' deki prosedür takip edilerek hazırlanmıştır.

Tablo 2.1: Doku Fiksasyonu.

Akan suda	Bir gece
% 60 Alkol	1 saat
% 70 Alkol	1 saat
% 80 Alkol	1 saat
% 96 Alkol (I)	1 saat
% 96 Alkol (II)	1 saat
% 100 (Absolü) Alkol (I)	1 saat
% 100 (Absolü) Alkol (II)	1 saat
Xylen (I)	45 dakika
Xylen (II)	45 dakika
Parafin (I)	1 saat
Parafin (II)	1 saat

Mikrotomda dokulardan kesit alınabilmesi için dokular bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom ile rahat kesit alabilmek için bloklar bir süre buzdolabında soğumaya bırakıldı. Daha sonra bloklar mikrotoma (Thermo Elektron Corporation, Shandon Finesse E+, England) yerleştirildi. Işık mikroskopik incelemelerde en iyi görüntüyü sağlamak amacıyla kesit kalınlıkları 5 µm olarak ayarlandı. Kesilen dokular 55°C'ye ayarlanmış benmariye alındı. Doku etrafındaki parafin, sıcak suda açıldıktan sonra lamlara alındı. Daha sonra lamlar cam şalelere yerleştirildi ve 60°C etüvde bir gece tutularak boyama işlemine hazır hale getirildi.

2.3.1. Hematoksilen-eozin boyama metodu

Kesitlerin boyanmasında en sık kullanılan metotlardan birisi olan Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama metodu kullanıldı (Tablo 5). Boyanıp hazırlanan preparatlar Olympus CX41 mikroskopunda x40'lık büyütme altında incelendi ve elde edilen görüntüler Olympus DP20 dijital fotoğraf makinesi ile resimleri çekildi.

Tablo 2.2: Uygulanan Hematoksilen & Eosin Boyama Prosedürü.

Ksilen (I)	10 dak.
Ksilen (II)	10 dak.
Ksilen (III)	10 dak.
%100 alkol solüsyonunda	2 dak.
%96 alkol solüsyonunda	2 dak.
%80 alkol solüsyonunda	2 dak.
%70 alkol solüsyonunda	2 dak.
Akan suda	2 dak.
Hematoksilen solüsyonunda	5 dak.
Akan suda	4 dak.
Eosin solüsyonunda	30 saniye
%80 alkol solüsyonunda	2 kez daldır çıkar
%96 alkol solüsyonunda	2 kez daldır çıkar
%100 alkol solüsyonunda	5 dak.
Ksilen (I)	10 dak.
Ksilen (II)	10 dak.
Ksilen (III)	10 dak.
Entellan ile kapatıldı	

Her gruba ait siyatik sinir kesitleri histolojik olarak konjesyon şiddeti, miyelin dejenerasyon şiddeti ve vasküler proliferasyondaki dağılımları dikkate alınarak incelendi. Her bir kesit 0 – 3 arasında (sırası ile hasar yok, az hasar, orta derecede hasar ve şiddetli hasar) skorlandı.

Normal	0 (0)
Az hasar	+ (1)
Orta derecede hasar	++ (2)
Şiddetli hasar	+++ (3)

2.3.2. İmmünohistokimya boyama metodu

İmmünohistokimyasal inceleme için sinir dokusundan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dakika kaynatıldı. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS; pH 7.6) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Hæn 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dakika muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor (Rabbit polyclonal Anti-Fibronectin Antibody, 250500, Abbiotec, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dakika sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dakika streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dakika 3-amino 9 etil karbazol kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dakika Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akar suda 5 dakika yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

Kontrol, sham ve deney grupları arasındaki fibronektin immunreaktivitelerinin yoğunluğu semikantitatif olarak saptandı (Tablo 1). Semikantitatif değerlendirme: yok (-), zayıf (±), hafif (+), orta (++) , güçlü (+++), çok güçlü (++++) olacak şekilde yapıldı.

2.4.Biyokimyasal analiz

Numunelerin Muhafazası

Biyokimyasal analizler için elde edilen tüm dokular alüminyum folyo içine sarılarak numaralandı ve derin dondurucuda -25°C 'de muhafaza edildi. Derin dondurucudan çıkarılan dokuların buzlu çözöldükten sonra buzla soğutulmuş distile su ile yıkandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı (Doku üzerine yapışmış eritrositlerin uzaklaştırılması için).

Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu; 0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve hidroklorik asit (HCl) solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı. Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı (Akkuş ve Gürbilek, 1997).

Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Yaş ağırlıkları tartılan dokular soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe aktarıldı. Doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 13.500 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının az veya çok olmasına bağlı olarak doku ağırlığının 2, 5 ya da 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek tampon miktarları kaydedildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Daha sonra buz üzerinde sonikatör ile 30 saniye süreyle ve 30 saniye aralıklarla 3 kez sonike edildi. Homojenatın ısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan MDA ve homojenat protein tayini (Lowry metodu ile) yapıldı. Homojenatlar, 3200 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan CAT, GSH-Px, ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortexlenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi

Karaciğer, böbrek, beyin, kan MDA seviyeleri Draper ve Hadley (1990)'in metodu ile çalışıldı. Bu metodda lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit, +90 °C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli kompleks oluşur. Shimadzu UV-1700 (Japonya) marka spektrofotometri de ölçüm yapıldıktan sonra MDA- TBA kompleksi absorbans katsayısı $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Her gram protein başına nmol olarak ifade edildi (nmol g^{-1} protein). Tüm dokulardaki protein ölçümleri Lowry metoduna göre çalışıldı (Lowry ve ark., 1951).

Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Belirlenmesi

Vücutta endojen üretilen NO, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrit (NO_2^-)'e daha sonra da nitrat (NO_3^-)'a dönüşmektedir. Ayrıca proteinden zengin homojenatta NO analizi yapılırken spesifik olmayan reaksiyonlar da meydana gelebileceğinden, öncelikle numunelerde deproteinizasyon işlemleri yapıldı. Daha sonra nitrit ve nitrat seviyeleri ölçüldü.

Dokularda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyon işleminden sonraki Griess reaksiyonu ile belirlendi (Cortas ve Wakid, 1990). Total nitrit ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$), bakır kaplı kadmiyum granülleri ile nitrat redüksiyonu sağlanarak spektrofotometrik olarak 545 nm de değerlendirildi. Sonuçlar litrede mikromol protein olarak verildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi Sun ve ark. (1988)'nin metoduna göre hesaplandı. Bu metod ksantin/ksantin oksidaz enzim sistemi ile üretilen süperoksidin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi kullanılır. Ortamda oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli bileşik oluşturur. Bu renkli kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir.

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GSHPx aktivitesi Paglia ve Valentina metodu ile ölçüldü (Paglia ve Valentine, 1967). GSHPx enzimi, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile tekrar redükte glutasyon'a indirgenir. GSH-Px aktivitesinin hesaplanması 340 nm'de absorbans veren NADPH'ın $NADP^{+}$ 'a yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalması ile yapılır. Sonuçlar miligram protein başına uluslararası ünite olarak belirlendi.

2.5.İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Windows SPSS (SPSS 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılacaktır. Bütün biyokimyasal ve histopatolojik bilgiler ortalama \pm standart hata olarak sunulacaktır. Grupların dağılımı Shapiro - Wilk testi ile analiz edilecektir. Grup rat sayıları az olmasından, anormal dağılım gösterebileceğinden dolayı bilgilerin non-parametrik olduğu düşünülebilir. Bu yüzden Kruskal-Wallis H-test analizde kullanılacaktır. İki grup arası farklar Mann-Whitney U-testi ile değerlendirilecektir. $P < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

3. BULGULAR

Çalışmamızda ortaya çıkan verileri; histolojik bulgular, immunohistokimyasal bulgular ve biyokimyasal parametreler olarak üç başlık altında sıraladık.

3.1. Histolojik bulgular

Rat siyatik sinirindeki histolojik değişimler kantitatif olarak değerlendirildi ve skorlandı. Bu değerlendirmede ele alınan parametreler, vasküler konjesyon, vasküler proliferasyon ve miyelin dejenerasyon'du. Bu parametrelerin gruplar arasındaki değişimleri istatistiksel olarak araştırıldı ve $p > 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi.

Tablo 3.1: Gruplara ait histolojik değişikliklerin skorlarını gösteren tablo.

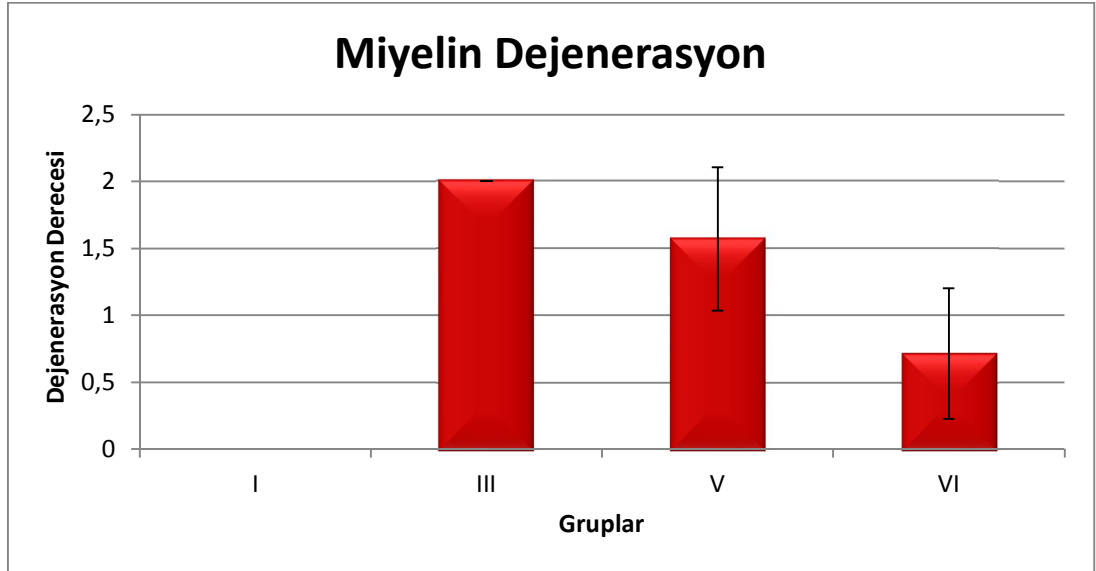
Gruplar	Vasküler Konjesyon	Vasküler Proliferasyon	Miyelin Dejenerasyon
I	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
II	0.143±0.378	0.000±0.000	0.000±0.000
III	2.143±0.378	1.714± 0.488	2.000±0.000
IV	2.143± 0.378	1.714± 0.488	2.000± 0.000
V	1.714± 0.488	1.571± 0.534	1.571± 0.534
VI	0.571± 0.534	0.857± 0.378	0.714± 0.488
P değeri			
I – III	0.000	0.001	0.000
I – V	0.001	0.001	0.001
I – VI	0.023	0.002	0.007
III – V	A.D.	A.D.	A.D.
III – VI	0.001	0.007	0.001
V – VI	0.005	0.019	0.015

A.D.: Anlamlı değil.

Tablo-3.1' deki değerler grup numaralarına uyacak şekilde; I: Kontrol, II: Sham, III: İskemi – Reperfüzyon (I/R), IV: I/R + %0.9 NaCl, V: I/R + 60 mg/kg ALA ve VI: I/R + 100 mg/kg ALA şeklinde numaralandırıldı. Tablo-3.1' deki

sonuçlara göre, her üç parametreyi birlikte değerlendirdiğimizde, Grup 1 ve 3 arasında anlamlı bir fark olduğu ve Grup 3'te artış gösterdiği; I/R+60 mg/kg ALA grubu (Grup 5)'nda azalan değerlerin Grup 3'e göre istatistiksel bir fark oluşturmadığı, I/R+100 mg/kg ALA grubu (Grup 6)'nda değerlerin daha da azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

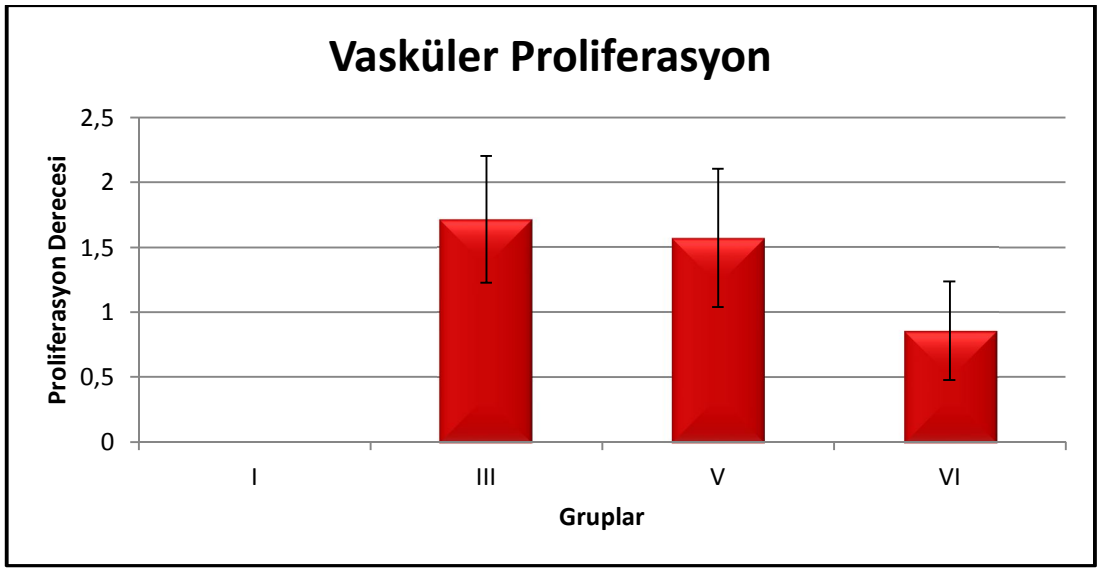
Histolojik bulgularda baktığımız parametreleri ayrı ayrı grafiklendirerek inceledik. Miyelin dejenerasyonu, kontrol (Grup 1) ve sham (Grup 2) gruplarında gözlenmezken; iskemi-reperfüzyon (Grup 3) ve iskemi-reperfüzyon ile birlikte %0.9 NaCl verilen grup (Grup 4)'larda aynı derecede ve istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gösterdiğini saptadık. Artış gösteren miyelin dejenerasyonun, ALA verilen gruplarda (Grup 5 ve 6), ALA verilme dozu ile doğru orantılı olarak azaldığını saptadık. 60 mg/kg ALA verilmesi, iskemi-reperfüzyon grubu (Grup 3) ile bir fark oluşturmadığı görüldü. 100 mg/kg ALA verilen grubun (Grup 6) ise diğer gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları tespit edildi (Tablo 3.1, Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Gruplar arasındaki miyelin dejenerasyon değişiklikleri.

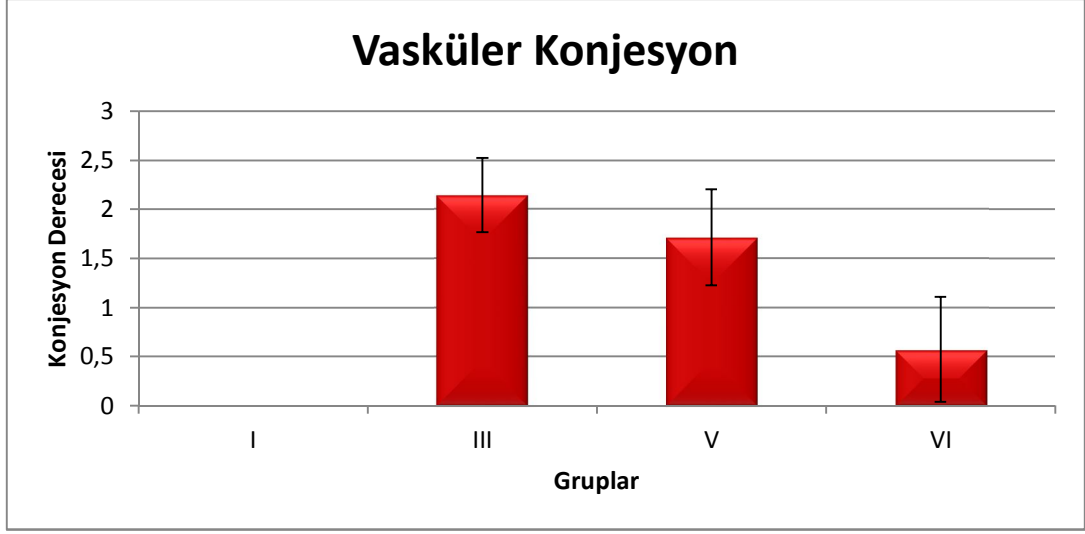
Vasküler proliferasyonda varolan değişiklikler, miyelin dejenerasyonun, gruplar arasındaki değişimlerine benzemektedir. Vasküler proliferasyonu, kontrol

(Grup 1) ve sham (Grup 2) gruplarında görülmedi. İskemi-reperfüzyon grubu (Grup 3) ve iskemi-reperfüzyon ile birlikte %0.9 NaCl verilen grup (Grup 4)'larda aynı derecede ve istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gösterdiğini; artış gösteren vasküler proliferasyonun, ALA verilen gruplarda (Grup 5 ve 6), ALA'nın verilme dozu ile doğru orantılı olarak azaldığını saptadık. 60 mg/kg ALA verilmesi, iskemi-reperfüzyon yapılan grup (Grup 3) ile bir fark oluşturmadığı görüldü. 100 mg/kg ALA verilen grup (Grup 6)'un ise diğer gruplar ile istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları tespit edildi (Tablo 3.1, Şekil 3.2).



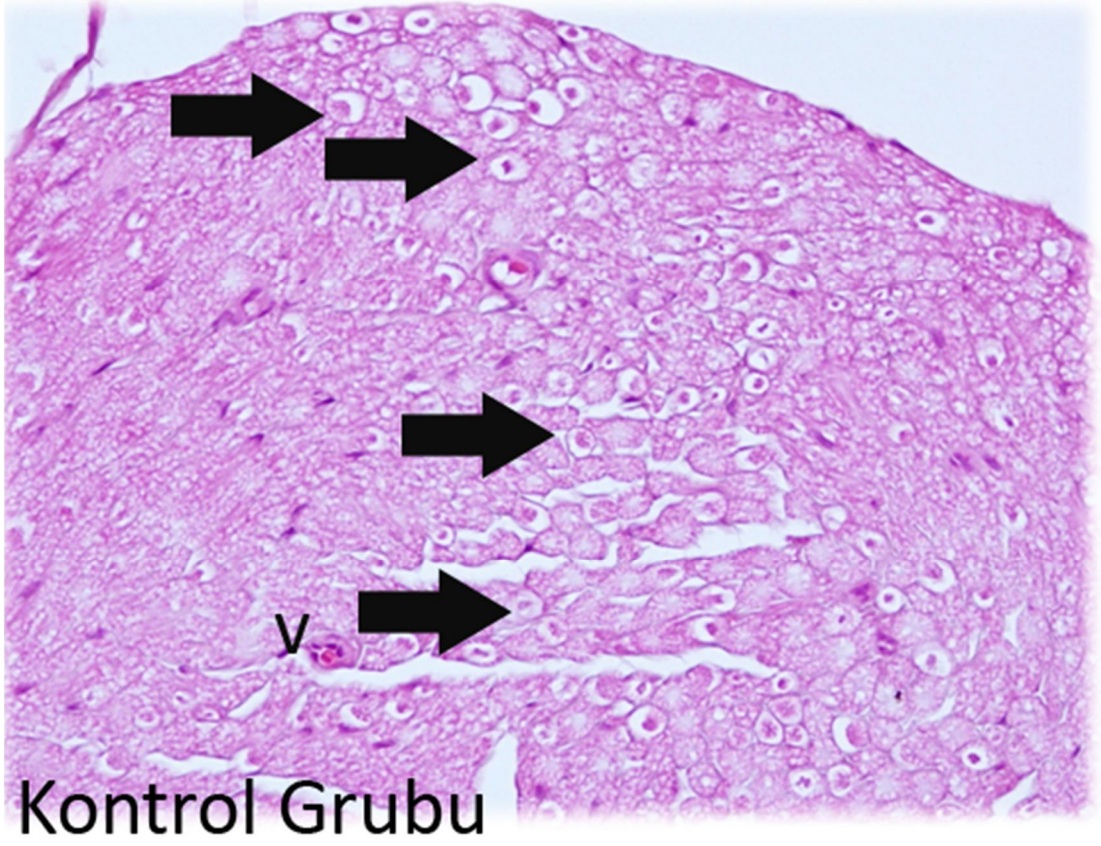
Şekil 3.2: Gruplar arasındaki vasküler proliferasyon değişiklikleri.

Vasküler konjesyonda izlediğimiz değişiklikler, vasküler proliferasyon ve miyelin dejenerasyondaki değişiklikler ve yapılan istatistiksel analizlerdeki sonuçlara benzediği görüldü (Tablo 3.1, Şekil 3.2).



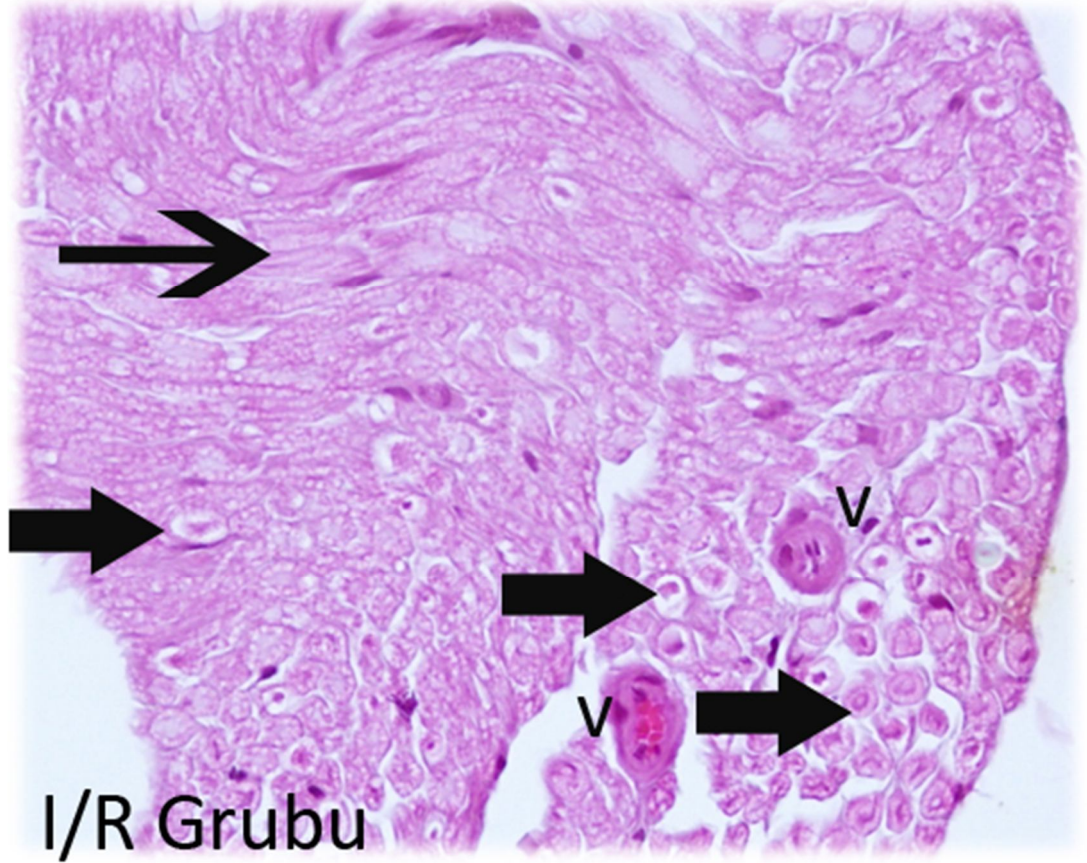
Şekil 3.3: Gruplar arasındaki vasküler konjesyon değişiklikleri.

Kontrol (Grup 1) grubundaki, hematoksilen-eosin boyama yöntemi kullanarak incelediğimiz kesitlerinde, vasküler ve miyelin yapılarını, normal histolojik bulgular olarak değerlendirdik (Resim 3.1). İskemi-reperfüzyon grubu (Grup 3)'ndaki dokuların histolojik incelemesinde, sinir liflerindeki aksonlarda kaybolma, miyelinde dejenerasyon ve vasküler yapıdaki konjesyon ve proliferasyon dikkat çekmekteydi (Resim 3.2). I/R + 0.5 ml. %0.9 NaCl verilen grup (Grup 4)'teki sinir liflerinde akson kaybolması, miyelin dejenerasyonu ve vasküler yapılarda proliferasyon ve oldukça belirgin konjesyon görüldü (Resim 3.3). İskemi gruplarında artan vasküler konjesyon ve proliferasyon ile miyelin dejenerasyonun, 60 mg/kg ALA verilmesi ile azaldığı görüldü. Histopatolojik bulguların varlığı dikkat çekti. (Resim 3.4). I/R + 100 mg/kg ALA grubu (Grup 6)'nda ise 100 mg/kg ALA verilmesinin, 60 mg/kg verilmesine göre, sinirde miyelin dejenerasyonda azalma – kaybolma ve vasküler yapılardaki konjesyon ile proliferasyondaki azalma daha belirgin olarak görüldü (Resim 3.5).

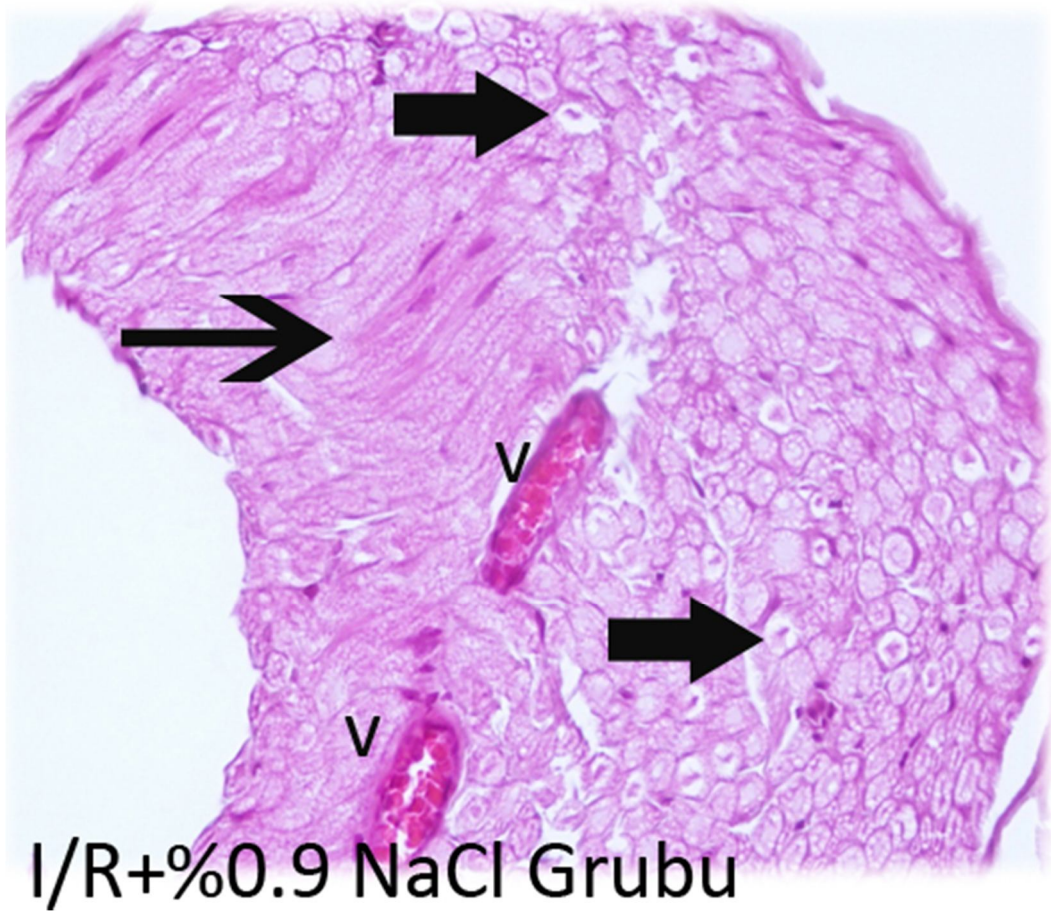


Resim 3.1: Grup 1'e ait rat siyatik sinir dokusundan histolojik bir görünüm.

v: Vasküler yapılar, kalın oklar: Miyelinli aksonlar olarak gösterildi (H-E X 40).

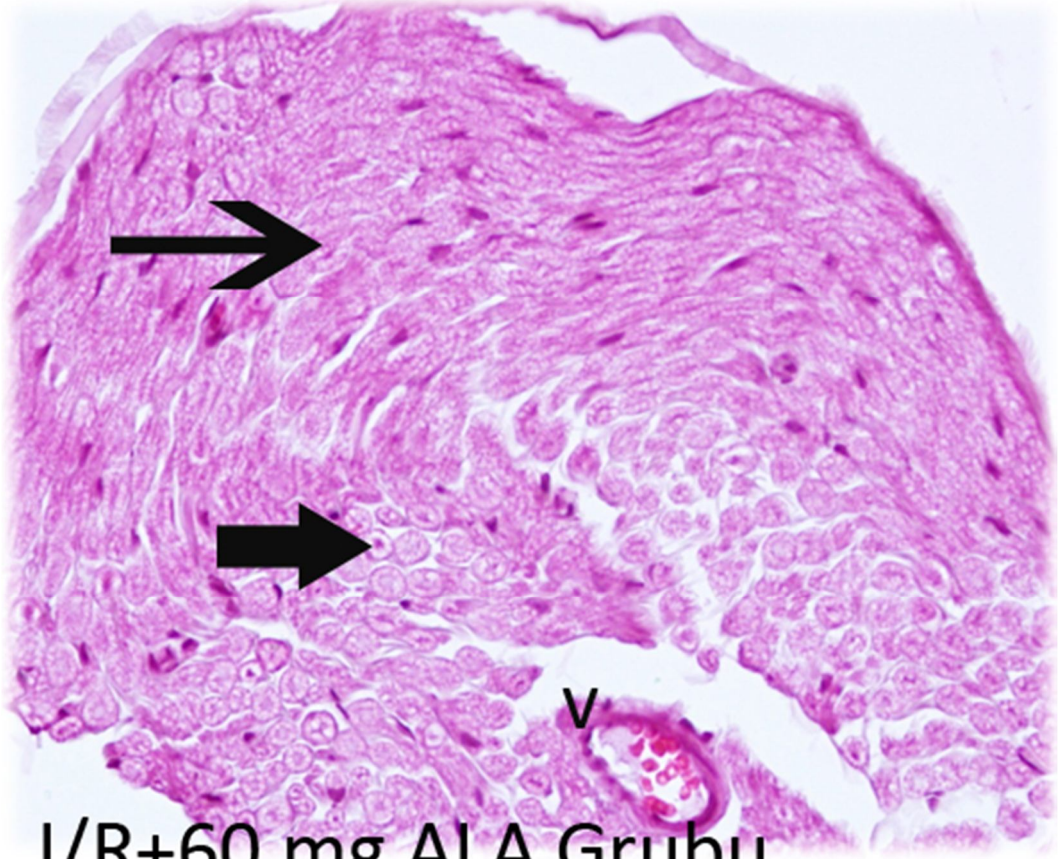


Resim 3.2: Grup 3'deki siyatik sinirine ait histolojik bir görünüm.
v: Vasküler yapılar, kalın oklar: Miyelinli aksonlar, ince oklar: Demiyelinize sinir liflerini göstermektedir (H-E X 40).



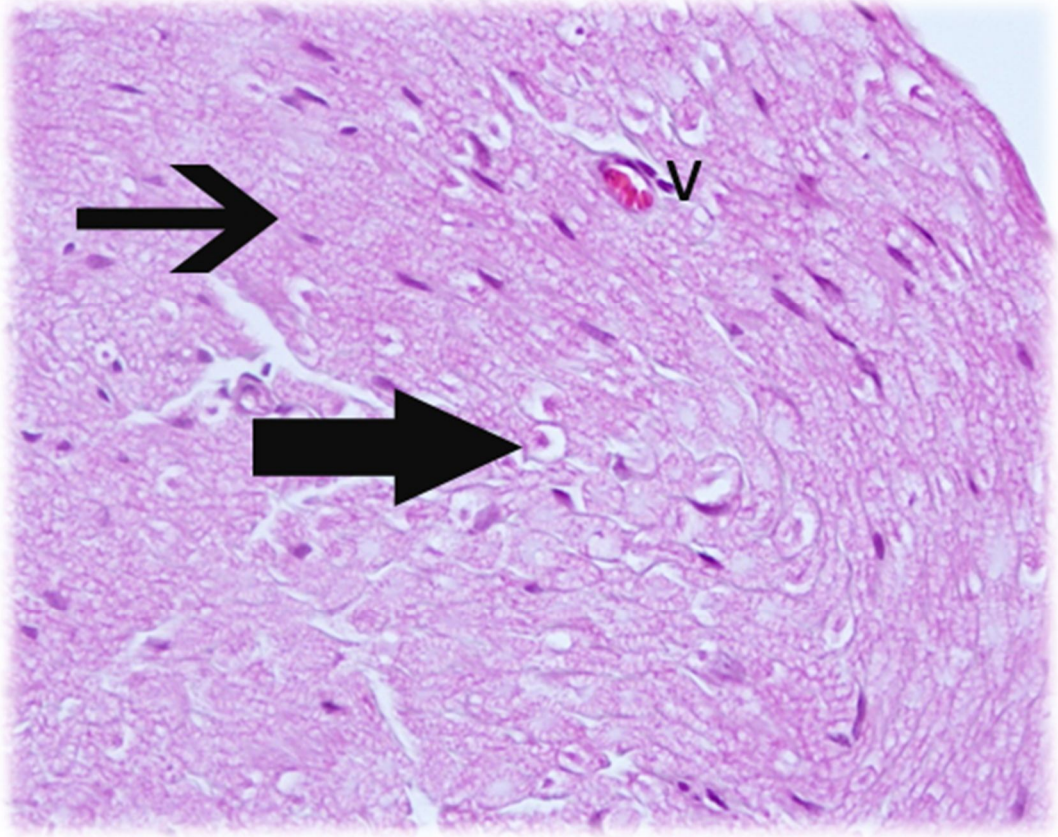
Resim 3.3: Grup 4'e ait siyatik sinirin histolojik bir görünümü.

V: Vasküler yapılar, kalın oklar: Miyelinli aksonlar, ince oklar: Demiyelinize sinir liflerini göstermektedir (H-E X 40).



Resim 3.4: 5. Gruba ait histolojik bir görüntü.

V: Vasküler yapılar, kalın oklar: Miyelinli aksonlar, ince oklar: Demiyelinize sinir liflerini göstermektedir (H-E X 40).



I/R+100 mg ALA Grubu

Resim 3.5: 6. Gruba ait histolojik bir görünüm.

v: Vasküler yapılar, kalın oklar: Miyelinli aksonlar, ince oklar: Demiyelinize sinir liflerini göstermektedir (H-E X 40).

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile yaptığımız anti-fibronektin antikolları ile işaretli siyatik sinir kesitlerini incelediğimizde epinöryum, perinöryum ve endonöryumda fibronektin immunoreaktivitesi dikkat çekti (Resim 3.6).

Kontrol (Grup 1) ve sham (Grup 2) gruplarına ait sinir dokularında yapılan incelemelerde, pozitif fibronektin reaktivitesinin zayıf olduğu saptandı (Resim 3.6, Tablo 3.2).

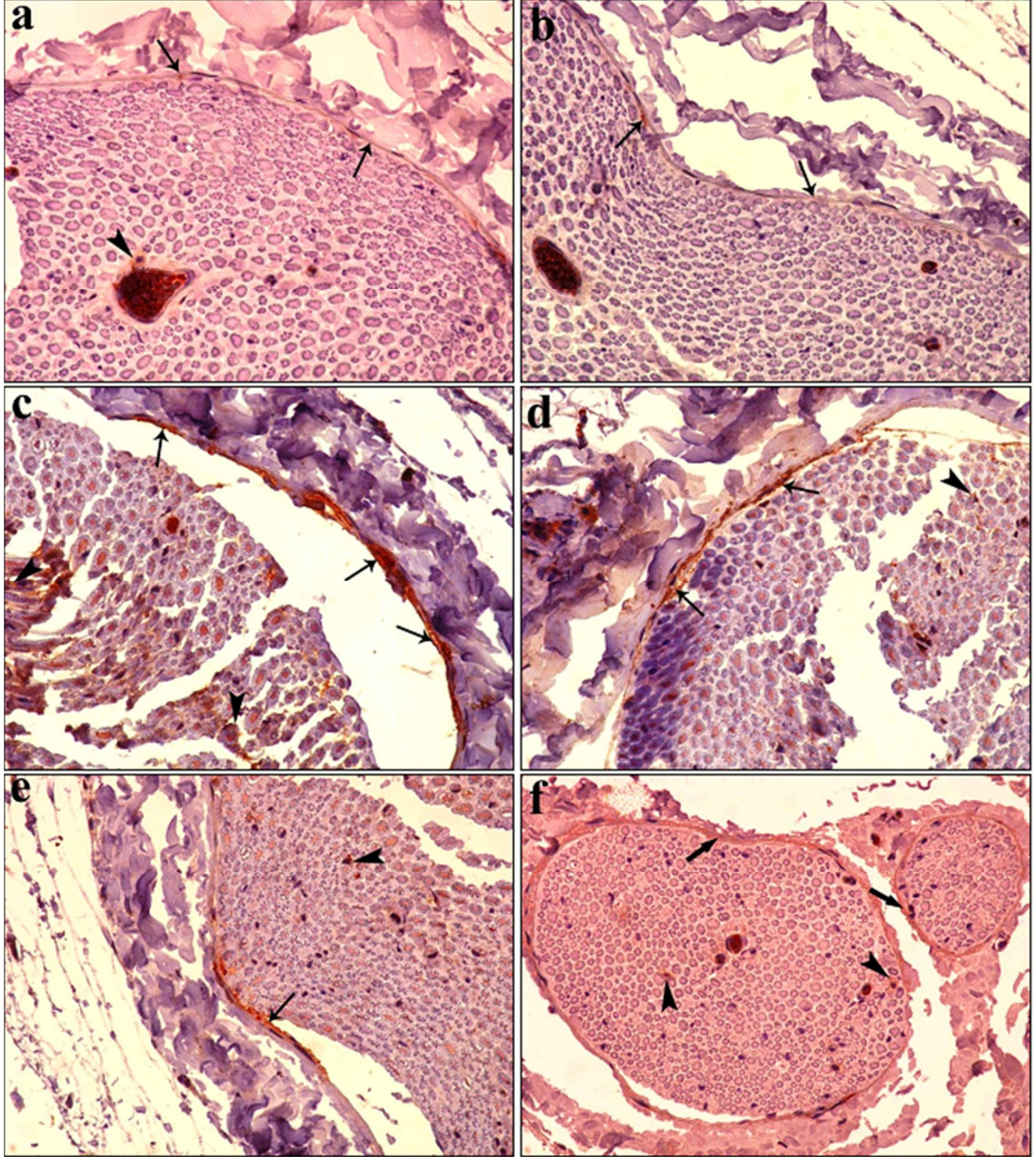
İskemi-reperfüzyon grubu (Grup 3) ve iskemi-reperfüzyon ile birlikte %0.9 NaCl verilen grup (Grup 4)'a ait sinir dokularında yapılan incelemelerde ise, her üç sinir kılıfında da yaygın kuvvetli fibronektin immunoreaktivitesi gözlenirken, ALA verilen gruplar (Grup 5 ve 6)'da fibronektin reaktivitesinin, Grup 3 ve 4'e göre daha zayıf olduğu dikkati çekti (Resim 3.6, Tablo 3.2).

Tedavi grupları arasında yapılan değerlendirmede ise 100 mg/kg ALA verilen grup (grup 5)'da, 60 mg/kg ALA verilen gruba (grup 6) göre fibronektin immunoreaktivitesinin daha az olduğu izlendi. ALA verilen gruplar (grup 5 ve 6)'da I/R gruplar (grup 3 ve 4)'na oranla fibronektin reaktivitesi ve dağılımının her üç sinir kılıfında da belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Resim 3.6, Tablo 3.2).

Semikantitatif değerlendirme yok (-), zayıf (\pm), hafif (+), orta (++), güçlü (+++), çok güçlü (++++), olacak şekilde yapıldı.

Tablo 3.2: Kontrol, sham ve deney grupları arasındaki fibronektin immunoreaktivitelerinin yoğunluğunun semikantitatif olarak değerlendirilmesi

	Kontrol Grup 1	Sham Grup 2	I/R Grup 3	I/R+SF Grup 4	I/R+60 mg/kg ALA Grup 5	I/R+100 mg/kg ALA Grup 6
Fibronektin	±	±	+++	++++	+++	++



Resim 3.6: Sinir dokusuna ait farklı gruplardaki fibronektin immunoreaktivitesi gösteren ışık mikroskopik görüntüler. İnce ok: Epinöryum, kalın ok: Perinöryum, ok başı: Endonöryum (İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, x400).

Resim 3.6'ya göre a: Kontrol (Grup 1), b: Sham (Grup 2), c: I/R (Grup 3), d: I/R+SF (Grup 4), e: I/R+60 mg ALA (Grup 5), f: IR+ 100 mg/kg ALA (Grup 6) olarak gösterildi.

3.3. Biyokimyasal parametreler

Bu değerlendirmede ele alınan parametreler, SOD ve GSHPx enzim aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri olup gruplar arasındaki değişimler Tablo 3.3' de gösterildi. Gruplar arasındaki değişimlerin istatistiksel analizinde, $p>0.05$ değeri anlamlı kabul edilmedi.

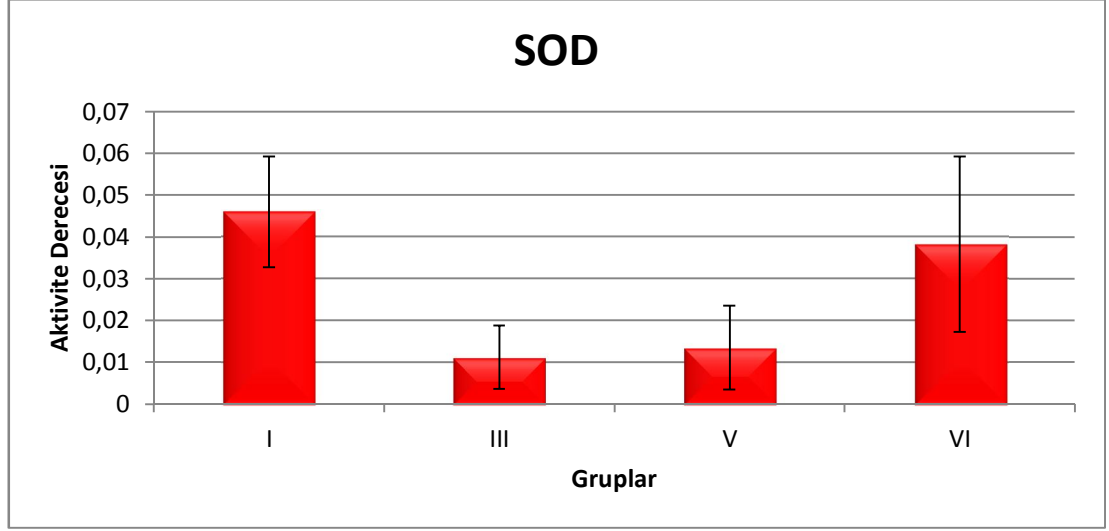
Tablo 3.3: SOD ve GSHPx enzim aktiviteleri ile MDA, NO düzeyleri.

Gruplar	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)	GSHPx (U/mg protein)	NO (μ mol/g protein)
I	0.0460 \pm 0.0133	75.4831 \pm 9.1936	1.5900 \pm 0.1057	8.2504 \pm 0.9611
III	0.0112 \pm 0.0076	85.1650 \pm 7.5948	1.0397 \pm 0.1413	6.7877 \pm 0.6862
V	0.0135 \pm 0.0100	74.8688 \pm 7.2847	1.3824 \pm 0.1478	7.4167 \pm 0.6895
VI	0.0382 \pm 0.0210	66.7438 \pm 8.4046	1.5305 \pm 0.1567	7.5517 \pm 0.7095
P değeri				
I - III	0.001	0.026	0.001	0.007
I - V	0.002	A.D.	0.026	A.D.
I - VI	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
III - V	A.D.	0.038	0.004	A.D.
III - VI	0.017	0.007	0.001	A.D.
V - VI	0.026	A.D.	A.D.	A.D.

A.D.: Anlamlı değil.

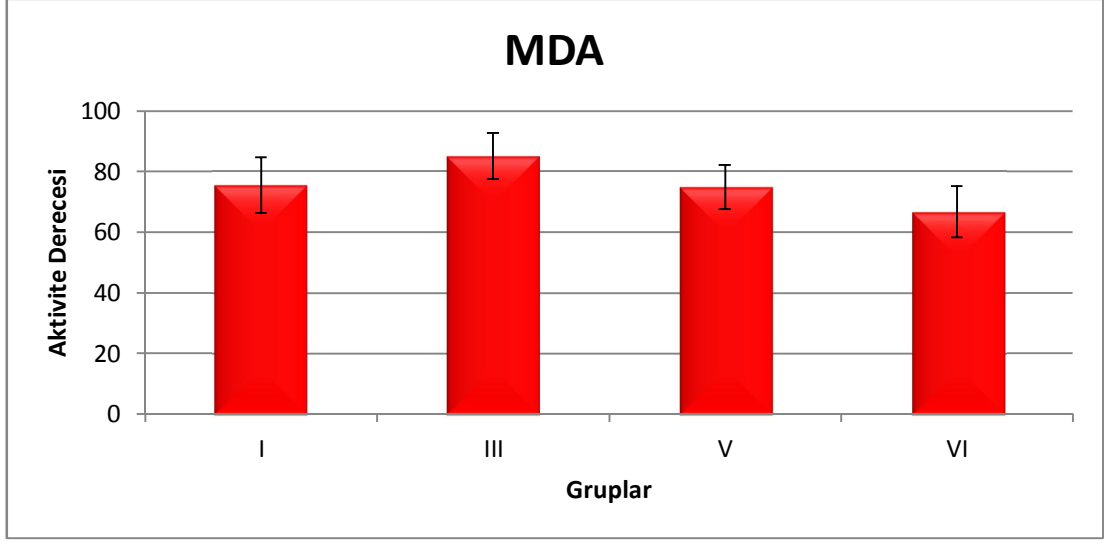
Tablo-3.3'deki değerler I: Kontrol, II: Sham, III: İskemi – Reperfüzyon (I/R), IV: I/R + %0.9 NaCl, V: I/R + 60 mg/kg ALA ve VI: I/R + 100 mg/kg ALA şeklinde numaralandırıldı.

SOD enzim aktivitesinin Grup 3 ile birlikte azaldığı; 60 mg/kg ALA verilen grup (Grup 5)'teki enzim seviyesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde olduğu; 100 mg/kg ALA verilen grup (Grup 6)'ta ise artışın belirgin oranda ve anlamlı ölçüde olduğu saptandı (Tablo 3.3, Şekil 3.4).



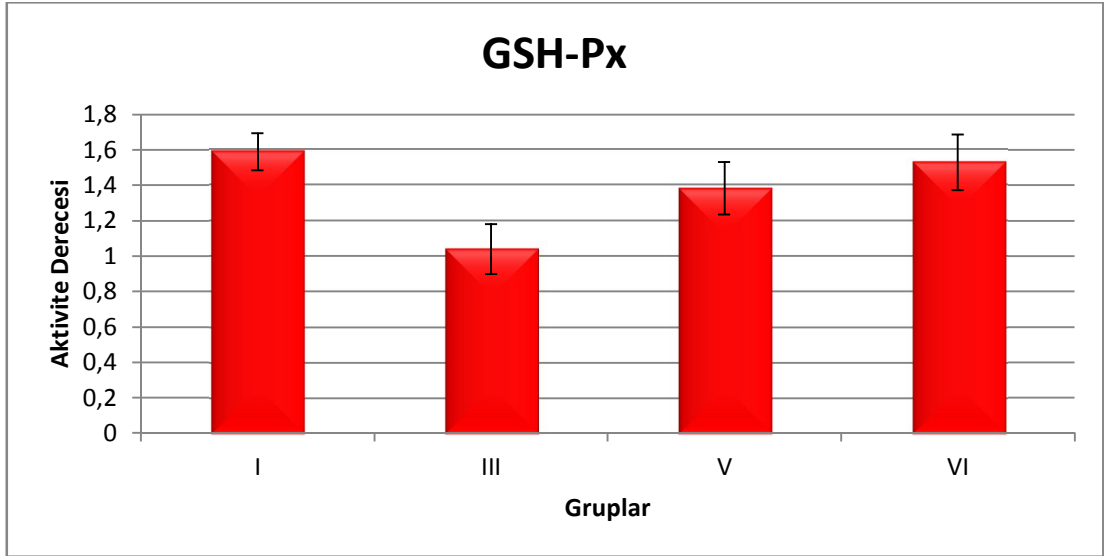
Şekil 3.4: Gruplar arasındaki SOD enzim aktivite değişiklikleri.

İskemi-reperfüzyon grup (Grup 3)'u ile anlamlı artış gösteren MDA seviyesi, ALA verilme dozu ile paralel olarak düştüğü görüldü. Grup 3 ile ALA verilen gruplar arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı iken ALA grupları arasındaki değişimde bir fark görülmedi (Tablo 3.3, Şekil 3.5).



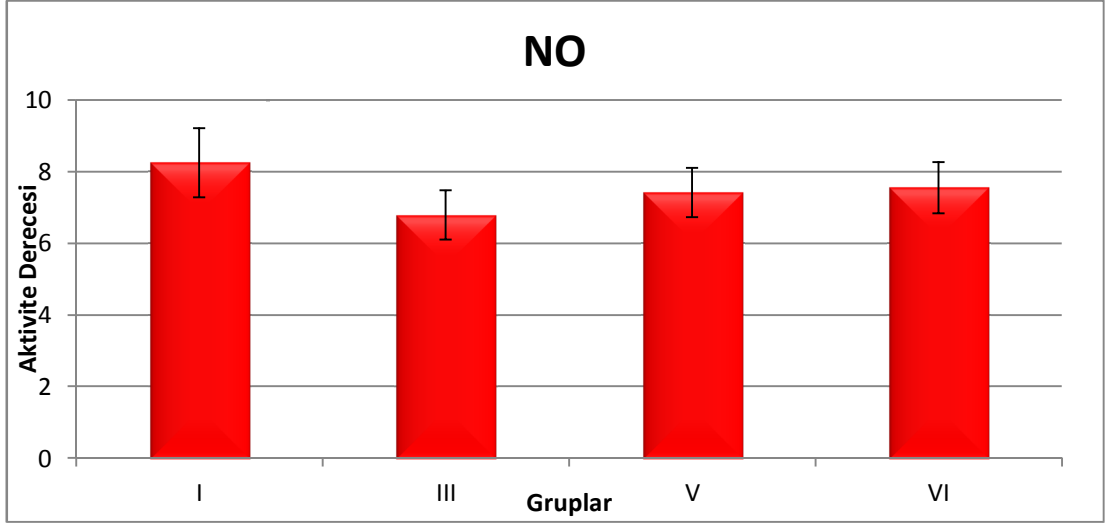
Şekil 3.5: Gruplar arasındaki MDA seviye değişiklikleri.

GSHPx enzim aktivitesinin Grup 3 ile birlikte azaldığı; ALA verilme dozu ile orantılı ve istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı izlendi (Tablo 3.3, Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Deney ve tedavi grupları arasındaki GSH-Px enzim aktivite değişiklikleri.

İskemi ile azalan, tedavi gruplarında ve doza bağlı artış gösteren NO seviyelerinin, gruplar arasında (kontrol ile iskemi grupları arasındaki hariç) istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı saptandı (Tablo 3.3, Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Deney ve tedavi grupları arasındaki NO seviye değişiklikleri.

4. TARTIŞMA

Rat siyatik sinir modeli, sinir yaralanması sonrası fonksiyonel değişikliklerin incelenmesinde ve farklı cerrahi yöntemler ve medikal tedavilerin etkinliğinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda ALA'nın, ratlara uyguladığımız iskemi ve reperfüzyon sonrası siyatik sinire olan etkilerini inceledik. İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak parametrelerimizdeki dejeneratif bulgulara karşılık ALA verilmesinin, olumlu etkiler gösterdiğini gözlemledik.

Gelişmekte olan periferik sinir sisteminde hücre dışı matriksin önemli bir bileşeni olan fibronektin, sinir rejenerasyonuna katkıda bulunur. Fibronektinin periferik sinir tamirinde, sinir ve kas greftine göre daha elverişli bir materyal olduğu kanıtlanmıştır. Fibronektin gen delesyonu olan farelerde, ciddi kardiyovasküler ve sinir sistemi defektleri olduğu görülmüştür. Normal periferik sinirde fibronektin tutulumu schwann hücre, kan damarları ve perinöriumun tüm katmanlarındaki perinöral hücre bazal laminalarında belirgindir. Fibronektin, yüksek molekül ağırlıklı ekstrasellüler matriks glikoproteinidir. İntegrin de denilen membran - spanning reseptör proteinlerini bağlar. Fibronektin, ekstrasellüler matriks farklılaşmasında önemli rol oynar. Çeşitli hücre tipleri tarafından eksprese edilir ve vertebralaların gelişiminde çok önemlidir. Fibronektin, plazmada (300 µg/ml) ve diğer vücut sıvılarında çözünür formda bulunur. Ekstrasellüler matrikste çözünemeyen formda bulunmaktadır. Fibronektin çözünürlük özelliğine göre iki şekildedir. Bunlar, çözünür plazma fibronektin ile az çözünür hücresel fibronektindir. Plazma fibronektini esas olarak hepatositlerde sentezlenir. Sellüler fibronektin, fibronektin isoformlarının oluşturduğu daha büyük ve daha heterojen bir gruptur. Tek bir fibronektinin kodladığı prekürsör haberci ribonükleik asit (mRNA)'in çok sayıda varyant oluşturma kapasitesi vardır. Böylece farklı adezyon, ligant bağlama ve çözünürlük özelliklerine sahip fibronektinler ortaya çıkar. Bu durum, ekstrasellüler matriksin bileşimini gelişim sırasında veya dokuya spesifik olarak ayarlanması için hücrelerin kullandığı bir mekanizma oluşturur. Çalışmamızda tüm siyatik sinir

dokusundaki epinöryum, perinöryum ve endonöryumda fibronektin immünoreaktivitesinin I/R sonrası belirgin şekilde artması oluşan hasara sinir dokusunun tepkisini göstermektedir. Sinir dokusunda hasarı gidermek için ileri derecede fibronektin artışı gerçekleşmiştir. Periferik sinir hasarının, fibronektin salınımı ve dağılımı üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, civcivlerin sağ tarafındaki medial – ulnar siniri kesilip, fibronektinin rejenere olan sinirdeki dağılımı incelenmiş ve sinir kesisinden bir hafta sonra rejenere olan sinirde, kontralateral kontrol sinire göre, fibronektin ekspresyonunda büyük bir artış görülmüştür. Fibronektin reseptörlerinin dağılımı, fibronektinin, hem aksonlar hem de schwann hücre göçü ve akson rejenerasyonu sırasında kullanıldığını göstermektedir. Bu bölgede artmış fibronektin, plazma kaynaklı ya da rejenerasyon bölgesindeki fibroblast ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir. Böylece fibronektin, sinir rejenerasyonunu iki mekanizma yoluyla kolaylaştırabilir. Birincisi, yara bölgesindeki schwann hücre göçünü arttırarak. Schwann hücre yüzeyleri, nörit uzamasını güçlü bir şekilde uyaran çok sayıda adezyon molekülleri içerdiğinden, dolaylı olarak bu hücreler akson büyümesi için çekici bir ortam oluşturabilmektedir. İkinci mekanizma da direkt bir yol olup, fibronektinin kendisi nöronal adezyon ve nörit uzaması için çekici bir glikoprotein olduğudur. Fibronektinin rejenere olan büyüme konileri ve aksonlar yakınında artmış olan ekspresyonu, fibronektinin rejenere olan aksonlar için bir ortam oluşturduğunu kuvvetle düşündürür. Sonuç olarak artmış fibronektin ekspresyonu, sinir kesisine bağlı oluşan yara yeri yanıtının bir özelliği olup, bu özellik, schwann hücre göçünün ve akson uzamasının uyarılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Siyatik sinirin gelişiminde görülen fibronektin artışı, benzer düzeyde bu sinirin yenilenmesinde de gözlenmektedir. Çalışmamızdaki iskemi grubunda görülen fibronektin artışını, periferik sinir hasarına bağlıdır, bu artışın amacı, kesilmiş sinir segmentleri arasındaki bağlantıları tekrar kurmak, sinir rejenerasyonunu sağlamak amaçlıdır. Nacar ve ark. (2007)' nin çalışmasındaki diyabet oluşturulan ratlarda, siyatik sinirin hücre dışı matriksinde fibronektin immünoreaktivitesinin belirgin artışı bulgularımızla paralellik göstermektedir. (Nacar ve Ömeroğlu, 2004; Pankov ve Yamada, 2002; Lefcort ve ark., 1992; Akkasoglu ve ark., 2003).

Çalışmamızda, iskemi – reperfüzyon sonrası oluşturulan sinir hasarına bağlı fibronektin reaktivitesindeki artış, ratlara ALA verilmesiyle azaldığı ve hatta tedavi dozu artırılmasının da (100 mg/kg) bu yoğunluğu daha da azalttığını saptadık. Lee ve ark.(2009) diyabetik ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, ALA verilen ratlardaki fibronektin protein düzeylerinde düşme olduğunu göstermesi, Tuttle ve ark. (2009), yüksek glukoz ve aminoasit düzeylerini arttırmak için verilen proteinli yemekten sonra, rat mezengial hücrelerinde ALA'nın fibronektin indüksiyonunu inhibe ettiğini göstermesi ALA'nın fibronektin üzerine olan inhibe edici etkisini göstermekte ve bulgularımızı desteklemektedir. Diğer bir çalışmada, yüksek glukoz düzeyi altında domuz mezengial hücre kültürlerini ve bu hücrelerin antioksidan savunma durumundaki etkileri karşılaştırıldığında; yüksek glukozlu ortamda, mezengial hücre kültürlerindeki fibronektin gen ekspresyonunun önemli oranda artış gösterdiği ve yüksek glukoz düzeyindeki hücre kültürlerine ALA eklenmesinin, fibronektin gen ekspresyonunu anlamlı ölçüde düşürdüğü görüldü. Bu bulguların, bir antioksidan olarak ALA'nın iskemiye uğramış siyatik sinir dokusunun rejenerasyonunda etkili olabileceği ve sinir dokusunu koruyabileceğini düşündürmektedir (Catherwood ve ark., 2002).

Histopatolojik değişikliklerde ele aldığımız parametreler vasküler konjesyon, vasküler proliferasyon ve miyelinde meydana gelen dejenerasyondur. Mitsui ve ark. (1999)'nın çalışmasında, rat periferik sinirinde iskemi - reperfüzyon yaralanmasına ALA'nın etkisinin araştırıldığı çalışmada, siyatik ve tibial sinirleri besleyen arterlerin her ikisine 3 ya da 5 saat sürelerle iskemi, takibinde reperfüzyon sonrası tedavi gruplarına i.p. 3 gün boyunca 100 mg/kg ALA verilmesiyle tibial sinirin dejenerasyonundaki azalmalar, bulgularımızı desteklemektedir. Çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak, iskemi ile oluşan fibril dejenerasyonu ve ödemin, ALA tarafından azaltıldığı ve böylece sinir hasarının korunduğunu söyleyebiliriz. Al-Attar ve ark. (2010) ise bir organofosfat olan malathion maruz bırakılan ratlarda ALA'nın etkisini histopatolojik olarak gösterdiler. Bir ay boyunca malathion verilmesi ile rat karaciğer hücrelerinin birçoğunda nekroz görüldü. Hepatositlerdeki vakuol formasyonu ve sinüzoidlerdeki düzensizlik, lökosit infiltrasyonu, kan damarlarında hemoraji ile birlikte konjesyon ve dilatasyon saptandı. ALA verilmesinin ise

karaciğerdeki santral ven etrafındaki hücre düzensizliklerini tersine çevirdiği ve nekrozisi azalttığı tespit edildi. Artwohl ve ark. (2007) in-vitro olarak hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, ALA'nın vasküler endotel hücre apoptozisini ve proliferasyonunu inhibe ederek vasküler yapıyı koruduğunu gösterdiler. ALA'nın çeşitli dokulardaki farklı patolojik değişikliklere karşı gösterdiği olumlu değişiklikler, çalışmamızda görülen histolojik bulgulardaki sonuçlarla benzerlik göstermekteydi.

MDA, lipid peroksidasyonu esnasında oluşmakta ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona girmesi nedeni ile ölçümlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bagdatoglu ve ark. (2006), rat siyatik sinirine iskemi – reperfüzyon yaptıktan sonraki MDA seviyelerinde, kontrol grubuna göre çalışmamızdaki gibi anlamlı olarak yükseldiğini saptadılar. Senoglu ve ark. (2009) crush yaralanmasından sonraki rat siyatik sinir hasarının, ALA ile önlenibilme durumunun araştırdılar ve LA yerine salınan gruplarda doku MDA enzim düzeyinin yüksek; tedavi gruplarında ise düşük olduğunu tespit ettiler. Böylece, siyatik sinir crush yaralanmasından önce ALA verilmesinin, oksidatif stresi azaltmaya bağlı olarak crush yaralanmasına karşı koruyucu olduğunu saptadılar. Bu araştırmadaki MDA enzim düzeylerindeki değişim, çalışmamızdaki değişimlerle uyum göstermektedir. Cosar ve ark. (2007) ALA'nın, ovaryum iskemi – reperfüzyonuna olan etkisine baktıkları çalışmada, iskemi gruplarında yüksek olan doku ve plazma MDA düzeyinin, ALA verilmesiyle belirgin olarak düştüğünü saptadılar. Hagen ve ark. (1999), yaş ile ilişkili olarak rat hepatositlerin oksidatif hasar, metabolik hız ve bunlar üzerine ALA'nın etkisini incelediler. Yaşlı ratlarda MDA düzeyleri, genç ratlara göre 5 kat fazla artarken; R-LA verilen yaşlı ratlarda MDA düzeyleri ise belirgin düzeyde azaldığını saptadılar. Bu çalışmayla R-LA verilmesinin, oksidatif madde üretimini belirgin bir şekilde azaltıp yaşlanma ile ilişkili oksidan hasardaki artışı engellediğini MDA seviyelerindeki değişim ile gösterdiler. Budin ve ark. (2009) ALA'nın, diyabetik ratlardaki plazma ve aort dokusunda MDA aktivitelerini inhibe ettiğini buldular. Amom ve ark. (2008) çalışmasında mikrozomal lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA oluşumu değerlendirdiler ve ALA verilen grubun, verilmeyen gruba göre MDA düzeylerini düşük buldular. Sehirli ve ark. (2008) kolit oluşturulan

ratlardaki MDA seviyesinde anlamlı derecede artış saptadılar. ALA verilmesiyle bu azalmanın normale döndüğünü gördüler. Sena ve ark. (2008) diyabetik ve aterosjenik diyetle beslenen ratlarda ALA'nın, endotelial fonksiyon üzerine etkileri ve ALA'nın yararlarının altında yatan mekanizmaları araştırdılar. Diyabetik ratlarda plazma MDA seviyelerini, aynı yaştaki normal ratlara göre anlamlı ölçüde yüksek buldular. Bu ratlara 3 ay boyunca aterosjenik diyet verilerek MDA düzeyleri daha da artış gösterdi. Bu ratlara ALA verilmesinin, diğer oksidatif stres parametreleri ile birlikte MDA'yı da bazal seviyeye indirdiğini saptadılar. Kronik sistemik D-galaktoz maruziyetine bağlı farelerde gelişen hafıza kaybı, sinir dejenerasyonu ve oksidatif hasara bağlı alfa lipoik asidin koruyucu etkinliğinin incelenmesinde, D-galaktoz maruziyetine bağlı olarak MDA enzim düzeyinin arttığı; ALA verilmesinin MDA seviyesini azalttığı ve buna bağlı olarak periferik oksidatif hasarın da azaldığı gösterilmiştir (Draper ve Hadley, 1990; Cui ve ark., 2006).

Literatürde, yüksek glukoz düzeyi ve buna bağlı olarak gelişen diyabet hastalıklarına karşı alfa lipoik asidin etkinliğini araştıran oldukça fazla sayıda araştırmalarla karşılaştık. Hiperglisemi, reaktif oksijen ürünlerini oluşturduğu gibi aynı zamanda antioksidan mekanizmaları zayıflatarak oksidatif stres oluşturur. Catherwood ve ark. (2002) mezengiyal hücreler ile bir kültür çalışmasını yaptılar. Hiperglisemi durumunda intrasellüler MDA'nın arttığı saptandı. Ortama ALA eklenmesinin, intrasellüler MDA düzeylerini normale çevirdiği bulundu. Bir tez çalışmasında, diyabetli sıçanlarda koenzim Q10 (CoQ10) ve ALA (ALA) desteklerinin, egzersizle oluşan lipid peroksidasyonu ve antioksidan durumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı ve egzersiz yapan ALA grubunun MDA düzeyi, egzersiz yapan diyabetli gruptan düşük olduğu bulundu (Tav, 2008).

MDA enzim değişiklikleri açısından değerlendirdiğimizde, ALA'nın bir antioksidan olarak iskemi – reperfüzyon sonrası rat siyatik sinirinde artan MDA değerlerini düşürerek gösterdiği koruyucu etkisini, farklı çalışmalarda farklı dokularda da gösterdiğini görüyoruz.

SOD'un fizyolojik görevi, hücreleri serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır. Buna karşılık ekstrasellüler sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür. SOD seviyesi, hücrel dejenerasyon ve antioksidan madde birikimi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar (Yapar, 2006; Hacıyakupoğlu ve ark., 2001).

Çalışmamızda, SOD enzim seviyesinin iskemi ile birlikte azaldığı; ALA verilmesiyle de arttığı gözlemlendi. Bu artışın daha yüksek dozda (100 mg/kg) ALA uygulaması ile belirgin oranda yükseldiği saptandı. Senoglu ve ark. (2009) siyatik sinir yaralanmasından sonra doku SOD aktivitesindeki düşüşün ALA verilmesiyle yükseldiğini gösterdiler. Cosar ve ark. (2007) ovaryum iskemisi sonrası saptadıkları SOD seviyesindeki azalmanın ALA verilmesiyle anlamlı şekilde yükseldiğini tespit ettiler. Millitao ve ark. (2010) pilokarpin ile indüklenen felçli ratlara verilen lipoik asidin, lipit peroksit ürünlerini düşürdüğü gibi SOD enzim düzeyinin arttığını saptadılar. Cui ve ark. (2006) farelerde periferik oksidatif stres artışını, SOD enzim düzeyinin azalması ile gösterdiler ve verilen ALA takviyesinin SOD enzim düzeyini yükselttiğini tespit ettiler. Yaptığımız literatür araştırmalarında elde ettiğimiz bu bulgular çalışmamızdaki sonuçları desteklemektedir. En önemli antioksidan enzimlerden biri olan SOD enzimi, süperoksit radikallerinin hidrojen perokside çevrilmesini katalize eder. Çalışmamızda iskemi/reperfüzyon sonrası SOD enzim seviyesinin düşüşünün, SOD enziminin harcanmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. ALA verilmesiyle elde edilen SOD düzeylerindeki yükselmelerin, ALA'nın antioksidan etkisini oluşturan yolların SOD artışını sağlamasına bağlı olduğu söylenebilir.

Süperoksit radikali SOD enzimi tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise ya GSHPx ya da katalaz enzimlerince suya dönüştürülür. Katalaz enzim aktivitesinin beyinde oldukça düşük düzeyde olması nedeniyle sinir sisteminde oluşan hidrojen peroksidin zararsız hale getirilmesinden temel olarak GSHPx sorumludur (Halliwell, 1992; Gaunt ve De Duve, 1976; Sinet ve ark., 1980).

Literatürde GSHPx enzim seviyelerinin oksidatif hasara bağı olarak azaldığı; antioksidan olarak verilen ALA'nın, GSHPx azalmasını normale döndürdüğü gözlemlendi. Çalışmamızda da, iskemi ile birlikte azalan GSHPx enzim düzeyinin ALA verilmesiyle artış gösterdiği saptandı. Odabasoglu ve ark. (2010), kronik inflamasyona maruz kalan ratlara verilen lipoik asidin, GSHPx aktivitesini düşürdüğünü buldular. Sehirli ve ark. (2008) kolit oluşturulan ratlarda, redükte glutasyon (GSH) seviyesinin anlamlı derecede azalmasına karşılık ALA verilmesinin bu azalmayı normale döndürdüğünü gösterdiler. Catherwood ve ark. (2002) mezengiyal hücrelerde hiperglisemi durumunda GSH'nin azaldığını; ALA verilmesinin bu azalmayı normal seviyelere döndürdüğünü saptadılar. Benzer bir çalışmada, artmış glukoz konsantrasyonuna bağı olarak gelişen oksidatif strese yanıtta, GSH konsantrasyonunun anlamlı ölçüde düşük olduğu görüldü. Aynı zamanda, oksidatif stresten önce LA verilmesinin, GSH azalmasını önlediği tespit edildi (Maddux ve ark., 2001). ALA sadece antioksidan olarak işlev görmekle kalmayıp aynı zamanda intrasellüler olarak dihidrolipoata indirgenerek GSH sentezindeki hız sınırlayıcı substrat olan sistenin daha kolay bulunmasını sağlar. GSH konsantrasyonunun normale dönmesinin bir sebebi de ALA'nın γ -glutamilsistein sentetaz subünitlerinin gen ekspresyonu üzerine olan direkt etkisi olabilir. Alfa lipoik asid, GSH rejenerasyonunu, sahip olduğu ditiyolan halkasının indirgeme özelliği ile okside GSH'ların indirgenmesini sağlayarak veya GSH-Px ve/veya GSH sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan γ -glutamilsistein sentetaz aktivitesini arttırarak yaptığı söylenebilir.

Çalışmamızdaki iskemi grubunda GSHPx tüketim hızının fazla olması, GSHPx'in düşüş nedeni olarak gösterilebilir. Tedavi gruplarına ALA verilmesi ile GSHPx seviyelerindeki yükselmenin nedeni, ALA'nın, lipid peroksidasyonunun sebep olduğu GSH tüketimini azaltması olabilir. ALA'nın bu etkisi tiyol grubu içermesinden kaynaklanabilir. Uygulanan LA'nın dozu arttıkça GSHPx'in artması, bu görüşü desteklemektedir.

Cosar ve ark. (2007) ovaryum iskemisindeki doku ve plazma NO seviyelerini, iskemi grubunda; tedavi grubuna göre daha yüksek saptadılar. Başka bir çalışmada, CoQ10 ve ALA takviyesi alan egzersiz gruplarında NO düzeyi, bu antioksidanların verilmediği egzersiz yapan diyabetli gruptaki NO düzeyinden düşük olduğu tespit edildi (Tav, 2008). Abdel-Zaher ve ark. (2009) farelerdeki potasyum siyanit ile indüklenerek oluşturulan felç ve mortaliteye karşı alfa lipoik asidin etkisine baktıklarında; tedavi öncesi NO seviyelerinin yüksek ve yükselmiş NO seviyelerinin ALA verilmesiyle düştüğünü buldular.

Serbest oksijen radikali üyesi olan ve sinir sisteminde de yaygın şekilde bulunan NO, süperoksit radikalleriyle birleşip peroksinitrite dönüşerek NO'nun yarılanma ömrünü azaltır. Çalışmamızda, iskemiden sonra ortamda bulunan NO seviyelerinin düşüşü, bu sayede gerçekleşmiş olabilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, rat siyatik sinir iskemi/reperfüzyon sonrası görülen fibronektin artışının ALA ile düşmesi, fibronektinin kesilmiş sinir segmentleri arasındaki bağlantıları tekrar kurmak ve sinir rejenerasyonunu sağlamak için üstlendiği fonksiyonun; iskemi sonrası doku iyileşmesinden daha ağırlıklı olduğunu göstermektedir. İskemi öncesi verilen ALA'nın sinir dokusundaki MDA'yı azaltmasının yanında SOD ve GSHPx enzim düzeylerini arttırmasıyla görülen olumlu değişiklikler, ALA'nın iskemiye maruz kalmış sinirde meydana gelen patolojik değişikliklere karşı koruyabileceğini ve aynı zamanda tedavi etkinliğini de arttırabilecek bir potansiyele sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Rat Siyatik Sinir İskemi Reperfüzyon Hasarına Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkisi

Lipoik asit (LA), pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde bulunan ve doğal olarak oluşan bir bileşiktir. LA, alkole bağlı karaciğer hasarı, mantar zehirlenmesi, diyabet, glokom, radyasyon hasarı, Chagas hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı (I/R), ağır metal zehirlenmesi ve HIV enfeksiyonu gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Bu çalışma ile ratlarda I/R sonrası siyatik sinir üzerine ALA'nın koruyucu etkisi ışık mikroskopik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. ALA'nın siyatik sinir üzerine koruyucu etkisi kanıtlanırsa, çeşitli nedenlerle siyatik sinir hasarı oluşma riski olan ya da oluşmuş hastalara uygun dozda ALA verilerek hasarın durdurabileceği ya da önlenebileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda ağırlıkları 250-300 gr arasında olan 42 adet Sprague-Dawney cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar, kontrol (Grup 1), sham (Grup 2), I/R (Grup 3), I/R + 0.5 ml %0.9 NaCl (Grup 4), I/R + 60 mg/kg ALA (Grup 5) ve I/R + 100 mg/kg ALA (Grup 6) olmak üzere altı gruba ayrıldı. Renal venin distal kısmından itibaren abdominal aorta'ya iki saat süreyle iskemi ve takibinde üç saat reperfüzyon uygulandı. Çıkarılan siyatik sinir dokuları histopatolojik inceleme için nötral tamponlu formaldehit solüsyonu içinde tespit edildi. Histopatolojik incelemede, hematoksilin-eosin boyama yöntemini kullanarak vasküler konjesyon ve proliferasyon ile miyelin dejenerasyonu semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal yöntemde ise fibronektin immünoaktivitesi araştırıldı. Biyokimyasal incelemeler için dokular ependorf tüplere alındı ve SOD ve GSHPx enzim aktiviteleri ile MDA ve NO seviyeleri değerlendirildi. Histolojik ve biyokimyasal verilerin istatistiksel değerlendirmesi ve karşılaştırmaları SPSS 16.0 bilgisayar programında sırası ile Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis H ve Mann-Whitney U testleri ile yapıldı.

Histopatolojik inceleme sonucu, iskemi grubuna siyatik sinir dokusunda, vasküler konjesyon ve proliferasyon ile miyelin dejenerasyonun anlamlı oranda arttığı; bu parametrelerin 100 mg/kg ALA verilmesi ile iskemi gruplarına göre belirgin düzeyde azaldığı görüldü. Gelişmekte olan periferik sinir sisteminde hücre dışı matriksin önemli bir bileşeni olan fibronektinin, iskemi grubunda belirgin oranda arttığı; buna karşılık ALA verilen gruplarda doz ile paralel olarak azaldığı görüldü.

Biyokimyasal incelemelerde; SOD ve GSHPx enzim aktivitelerinin iskemi ile birlikte azaldığı; buna karşılık 100 mg/kg ALA verilen grupta SOD ve GSHPx artışının daha fazla olduğu saptandı. I/R ile birlikte artan MDA seviyelerinin, ALA verilen gruplarda dozla ilişkili olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. I/R ile birlikte azalan NO seviyesinin, ALA verilen gruplarda arttığı görüldü. Ancak bunun istatistiksel bir anlamı yoktu.

Sonuç olarak, rat siyatik sinir iskemi/reperfüzyon sonrası görülen fibronektin artışının ALA ile düşmesi, fibronektinin kesilmiş sinir segmentleri arasındaki bağlantıları tekrar kurmak ve sinir rejenerasyonunu sağlamak için üstlendiği fonksiyonun; iskemi sonrası doku iyileşmesinden daha ağırlıklı olduğunu göstermektedir. İskemi öncesi verilen ALA'nın sinir dokusundaki MDA'yı azaltmasının yanında SOD ve GSHPx enzim düzeylerini arttırmasıyla görülen olumlu değişiklikler, ALA'nın iskemiye maruz kalmış sinirde meydana gelen patolojik değişikliklere karşı koruyabileceğini ve aynı zamanda tedavi etkinliğini de arttırabilecek bir potansiyele sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Alfa-lipoik asit, iskemi-reperfüzyon, koruyucu etki, rat, siyatik sinir.

SUMMARY

Protective Effect of Alpha Lipoic Acid on Rat Sciatic Nerve Ischemia Reperfusion Damage

Lipoic acid (LA), is a compound which is found in many prokaryotic and eucaryotic cell types and formed naturally. Lipoic acid, has been used for the treatment of the following conditions: alcohol-dependent liver damage, fungal intoxications, diabetes, glaucoma, damage by radiation, Chagas disease, neurodegenerative disorders, ischemia-reperfusion damage, heavy metal intoxications and HIV infections for a long time. In this study, protective effect of alpha-lipoic acid (ALA) on sciatic nerve following ischemia-reperfusion (I/R) in rats was investigated by using light microscopy and biochemical methods. Provided that the protective effect of ALA on sciatic nerve is proven, we think the damage of sciatic nerve that have already occurred or might occur in the patients due to various reasons may be prevented or stopped by giving ALA in convenient doses.

In this study, a total of forty-two Sprague-Dawley male rats whose weights are 250 to 300 gr were used. Rats were divided into six groups as follows: control (Group 1), sham (Group 2), I/R (Group 3), I/R + 0.5 ml %0.9 NaCl (Group 4), I/R + 60 mg/kg ALA (Group 5) and I/R + 100 mg/kg ALA (Group 6). Ischemia was carried out the abdominal aorta starting from the distal part of the renal vein for two hours followed by reperfusion for three hours. Extracted sciatic nerve tissues were fixed in formaldehyde solution with neutral pH for histopathologic analysis. In histopathologic analysis, vascular congestion and proliferation as well as myelin degeneration was evaluated semiquantitatively using hematoxylin-eosin staining method. In immunohistochemical method, fibronectin immunoreactivity was analyzed. For biochemical analyses, the tissues were taken in eppendorf microtubes and SOD and GSHPx enzyme activities as well as MDA and NO levels were measured. Statistical analyses for histological and biochemical data were done using Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis H and Mann-Whitney U and Pearson correlation tests of SPSS 16.0 computer program respectively.

As a result of histopathological investigations, vascular congestion and proliferation as well as myelin degeneration were found to be increased significantly in the sciatic nerve tissues of ischemia group; however, these findings were found to have diminished significantly in various degrees depending on the ALA groups by giving ALA (100 mg/kg). Fibronectin, an important component of extracellular matrix in the developing periferic nervous system, was observed to have increased significantly in ischemia group; on the other hand, it was observed to have decreased in paralel to the doses in the ALA given groups.

In biochemical analyses; SOD and GSHPx enzyme activities were found to be lower by ischemia, however, in the ALA group being given 100 mg/kg of ALA, SOD and GSHPx enzyme activities were found to have increased. In the ALA given groups, increased MDA levels by I/R was observed to have decreased significantly in a dose-dependent manner. The decreased NO level by I/R, was seen increased in ALA-given groups, though it was not statistically significant.

The fact that fibronectin increase observed after ischemia/reperfusion of rat sciatic nerve is reduced after administration of ALA indicates that fibronectin's function to reconnect cut nerve segments and regenerate nerves is more prominent than its function in tissue healing after ischemia. ALA administered before ischemia decreases MDA and increases SOD and GSHPx. We think that these positive changes show that ALA may protect against the pathological changes in ischemic nerve and may be used to devise more efficient treatments.

Key words: Alpha-lipoic acid, ischemia-reperfusion, protective effect, rat, sciatic nerve.

KAYNAKLAR

- ABDEL-ZAHER, A.O., ABDEL-HADY, R.H., ABDEL MONEIM, W.M., SALIM, S.Y. (2009). Alpha-lipoic acid protects against potassium cyanide-induced seizures and mortality. *Exp Toxicol Pathol*.
- AKAN, T.M. (2009). Sildenafil Sitrat ve Eritropoetin'in Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkileri. Uzmanlık tezi, Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı.
- AKKUŞ, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler. Mimoza Yayınları, No: 38, Sağlık dizisi 5, Konya.
- AKKUŞ, İ., GÜRBİLEK, M. (1997). Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. Öz Eğitim Yayınları, İstanbul.
- AL-ATTAR, A.M. (2010). Physiological and Histopathological Investigations on the Effects of α -Lipoic Acid in Rats Exposed to Malathion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- AL GHAFI, M.H., PADMANABHAN, R., KATAYA, H.H., BERG, B. (2004). Effects of alpha-lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Mo. Cell Biochem.*, **261**:123-135.
- ALTUNKAYNAK, M.E., ÜNAL, B., (2007). General View to Supporting Cell of Peripheral Nervous System and Myelination. *The Eurasian Journal of Medicine*, **39**:49-54.
- AMOM, Z., ZAKARIA, Z., MOHAMED, J., AZLAN, A., BAHARI, H., TAUFİK Hidayat BAHARULDİN, M., ARIS MOKLAS, M., OSMAN, K., ASMAWI, Z., KAMAL NİK HASSAN, M. (2008). Lipid Lowering Effect Antioxidant alpha-lipoic acid in experimental atherosclerosis. *J Clin Biochem Nutr*, **43**: 88-94.
- ANTHONY, D.C., VOGEL, F.S. (1996). Peripheral Nervous System. In: Ivan Damjanov, James Linder, editors. *Anderson's Pathology*. St. Louis, Missouri: Mosby, 2799-2810.
- ARINCI, K. ELHAN, A. (2001). Anatomi. 3. Baskı, 2. Cilt. Güneş Kitabevi, Ankara.
- ARTWOHL, M., MUTH, K., KOSULIN, K., MARTIN, R.D., HOLZENBEIN, T., RAINER, G., FREUDENTHALER, A., HUTTARY, N., SCHMETTERER, L., WALDHAUSL, W.K., BAUMGARTNER-PARZER, S.B. (2007). R-alpha lipoic acid inhibits endothelial cell apoptosis and proliferation: involvement of Akt and retinoblastoma protein/E2F-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **293**:681-689.
- BAE, E. H., LEE, K.S., LEE, J., MA, S.K., KIM, N.H., CHOI, K.C., FROKIAER, J., NIELSEN, S., KIM, S.Y., KIM, S.Z., KIM, S.H., KIM, S.W. (2008). Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **294**:272-280.
- BAGDATOĞLU, O.T., POLAT, G., BAGDATOĞLU, C., ATIK, U. (2006). Roles of nitric oxide, malondialdehyde and fibronectin in an experimental peripheral nerve ischemia-reperfusion model. *Microsurgery*, **26**:207-211.
- BEST, T.J., MACKINNON, S.E., (1991). Intra-neural vascular investigative techniques. *J Reconstr Microsurg*, **7 (3)**:245-246.

- BIEWENGA, G., HAENEN, G.R., BAST, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac*, **29**:315-331.
- BIEWENGA, G.P., BAST, A. (1995). Reaction of lipoic acid with ebselen and hypochlorous acid. *Methods Enzymol*, **251**:303-314.
- BILSKA, A., WLODEK, L. (2005). Lipoic acid – the drug of the future? *Pharmacological Reports*, **57**:570-577.
- BREITHAUPT-GROGLER, K., NIEBCH, G., SCHNEIDER, E., ERB, K., HERMANN, R., BLUME, H.H., SCHUG, B.S., BELZ, G.G. (1999). Dose-proportionality of oral thioctic acid– coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci*, **8**:57-65.
- BUDIN, S.B., OTHMAN, F., LOUIS, S.R., BAKAR, M.A., RADZI, M., OSMAN, K., DAS, S., MOHAMED, J. (2009). Effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and vascular wall of diabetic rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, **50(1)**:23-30.
- BURNETT, M.G., ZAGER, E.L. (2004). Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, **16 (5)**:1-7.
- BUSTAMANTE, J., LODGE, J.K., MARCOCCI, L., TRITSCHLER, H.J., PACKER, L., RIHN, B.H. (1998). Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*, **24(6)**:1023-1039.
- BUDISAVLJEVIC, M.N., HODGE, L., BARBER, K., FULMER, J.R., DURAZO-ARVIZU, R.A., SELF, S.E., KUHLMANN, M., RAYMOND, J.R., GREENE, E.L. (2003). Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol*, **285**:1138-1148.
- CADENAS, E. (2001). Handbook of antioxidants. [<http://books.google.com.tr>]. Erişim Tarihi: 10.05.2010.
- CARREAU, J.P. (1979). Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymology*, **62**:152-158.
- CATHERWOOD, M.A., POWELL, L.A., ANDERSON, P., MCMASTER, D., SHARPE, P.C., TRIMBLE, E.R. (2002). Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney International*, **61**:599-608.
- CLARK, W.M., RINKER, L.G., LESSOV, N.S., LOWERY, S.L., CIPOLLA, M.J. (2001). Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*, **32**:1000-1004.
- COOMBES, J.S., POWERS, S.K., ROWELL, B., HAMILTON, K.L., DODD, S.L., SHANELY, R.A., SEN, C.K., PACKER, L. (2001). Effects of vitamin E and α -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol*, **90**:1424-1430.
- CORTAS, N.K., WAKID, N.W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, **36**:1440-1443.
- COSAR, E., SAHIN, F.K., KÖKEN, G., TOY, H., BASARALI, K., BÜYÜKBAS, S. (2007). The protective effect of α -lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **47**:499-503.
- CREMER, D.R., RABELER, R., ROBERTS, A., LYNCH, B. (2006). Safety evaluation of alpha lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **46**:29-41.

- CUI, X., ZUO, P., ZHANG, Q., LI, X., HU, Y., LONG, J., PACKER, L., LIU, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J Neurosci Res*, **84(3)**:647-54.
- ÇINAR, Ö. (2008). Ratlarda Oluşturulan Siyatik Sinir Travma Modelinde Ketorolak Trometamin'in Etkileri, Uzmanlık tezi, Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fak. Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı.
- DRAPER, H.H., HADLEY, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **186**:421-431.
- ERSOY, E., BAYŞU, N. (1986). Biyokimya. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
- EVANS, J.L., GOLDFINE, I.D. (2000). α -Lipoic Acid: A Multifunctional Antioxidant That Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, **2(3)**:401-413.
- FAN, C., ZWACKA, R.M., ENGELHARDT, J.F. (1999). Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med*, **77**:577-592.
- FERNANDEZ, E., PALLINI, R., LAURETTI, L., SCOGNA, A. (1997). Neurosurgery of the peripheral nervous system: injuries, degeneration and regeneration of the peripheral nerves. *Surg Neurol*, **48**:446-447.
- FILINA, A.A., DAVYDOVA, N.G., ENDRIKHOVSKII, S.N., SHAMSHINOVA, A.M. (1995). Lipoic acid as a means of metabolic therapy of open-angle glaucoma. *Vestn Oftalmol*, **111(4)**:6-8.
- FROSTICK, S.P., YIN, Q., KEMP, G.J. (1998). Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, **18**:397-405.
- GATEI, M., SHKEDY, D., KHANNA, K.K., UZIEL, T., SHILOH, Y., PANDITA, T.K., LAVIN M.F., ROTMAN G. (2001). Ataxia-telangiectasia: chronic activation of damage-responsive functions is reduced by alpha lipoic acid. *Oncogene*, **20**:289-294.
- GAUNT, G.L., DE DUVE, C. (1976). Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *J Neurochem*, **26**: 749-59.
- GORACA, A., PIECHOTA, A., HUK-KOLEGA, H. (2009). Effect of alpha lipoic acid on Ips-induced oxidative stress in the heart. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **60(1)**:61-68.
- GORACA, A., SKIBSKA, B. (2008). Beneficial effect of alpha-lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bronchoalveolar lavage fluid. *J Physiol Pharmacol*, **59(2)**:379-86.
- GÖKMEN, F.G. (2003). Sistematik Anatomi. Güven Kitabevi, İzmir.
- GREEN, E.C. (1968): Anatomy of the Rat. Hafner Publishing Company, New york and London. 178-187.
- GÜVENÇ, M. (2008). Resveratrol, Lipoik Asit ve Vitamin C'nin Tip-1 Diyabetli Sıçanların Karaciğer, Böbrek ve Eritrositlerinde Lipofilik Vitaminler, Kolesterol ve Yağ Asidi Bileşimi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- HACİYAKUPOĞLU, G., İŞİGÜZEL, İ., ZORLUDEMİR, S., ZEREN, H., BAĞDATOĞLU, H., MENZİLETLİOĞLU, Ş., HACİYAKUPOĞLU, S., AKSOY, K., DAĞLIOĞLU, K. (2001). Early

ultrastructural findings and superoxide dismutase levels in experimental ischemic optic neuropathy: effect of hypertension and hypotension on ischemic changes. *Ophthalmologica*, **215**: 55-60.

HAGEN, T.M., INGERSOLL, R.T., LYKKESFELDT, J., LIU, J., WEHR, C.M., VINARSKY, V., BARTHOLOMEW, J.C., AMES, B.N. (1999). (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *The FASEB Journal*, **13**:411-418.

HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **344**:721-724.

HALLIWELL, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, **59**: 1609-1623.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1990). Free radicals and metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymology*, **186**:1-85.

HALLIWELL, B. (1974). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto*, **73**:1075-1086.

HEAD, K. (2001). Natural Therapies for Ocular Disorders Part Two: Cataracts and Glaucoma. *Altern Med Rev*, **6(2)**:141-66.

HERBERT, A.A., GUEST, J.R. (1975). Lipoic acid content of Escherichia coli and other microorganisms. *Arch Microbiol*, **106**:259-266.

HERMANN, R., NIEBCH, G., BORBE, H.O., FIEGER, H., RUUS, P., NOWAK, H., RIETHMILLER-WINZEN, H., PEUKERT, M., BLUME, H. (1996). Enantio selective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci*, **4**:167-174.

HİZAY, A. (2009). Siyatik Sinir'i Besleyen Vasa Nervorum'un Kaldırılması Sonrası Oluşan Dejenerasyon Alanlarının Morfometrik İncelenmesi ve FK506'nın Bu Dejenerasyon Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

HNIA, K., HUGON, G., RIVIER, F., MASMOUDI, A., MERCIER, J., MORNET, D. (2007). Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient mdx mice. *The American Journal of Pathology*, **170**: 633-643.

HOLT, S., MARLEY, R., FERNANDO, B., HARRY, D., ANAND, R., GOODIER, D., MOORE, K. (1999). Acute cholestasis – induced renal failure: effects of antioxidants and ligands for the thromboxane A₂ receptor. *Kidney International*, **55**:271-277.

ISHIDA, Y., OHARA, T., OKUNO, Y., ITO, T., HIROTA, Y., FURUKAWA, K., SAKAGUCHI, K., OGAWA, W., KASUGA, M. (2007). Alpha lipoic acid and insulin autoimmune syndrome. *Diabetes Care*, **30(9)**:2240-2241.

JACOB, S., RUUS, P., HERMANN, R., TRITSCHLER, H.J., MAERKER, E., RENN, W., AUGUSTIN, H.J., DIETZE, G.J., RETT K. (1999). Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med*, **27**:309-314.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., KELLEY, R.O. (1993). Temel histoloji. Barış kitabevi, İstanbul.

- KAGAN, V.E., SHVEDOVA, A., SERBINOVA E. (1992). Dihydrolipoic acid –a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem pharmacol*, **44**:1637-1649.
- KARACA, G. (2007). Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Doktora tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KARAKOYUN, B., YUKSEL, M., ERCAN, F., ERZİK, C., YEGEN, B.C. (2009). Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. *Inflammation*. **32(1)**:37-46.
- KEELE, B.B., McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1970). Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol Chem*, **245**:6176-6181.
- KHANNA, S., ATALAY, M., LAAKSONEN, D.E., GUL, M., ROY, S., SEN, C.K. (1999a). Alpha lipoic acid supplementation: Tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol*, **86**: 1191-1196.
- KHANNA, S., ROY S., PACKER, L., SEN. C.K. (1999b). Cytokine-induced glucose uptake in skeletal muscle: redox regulation and the role of alpha-lipoic acid. *Am J Physiol*, **276**:1327-1333.
- KIDD, P.M. (2005). Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients, stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Altern Med Rev*, **10(4)**:268-293.
- KIERSZENBAUM, A.L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. 1. Baskı, (Çev. Ed. Demir R.). Palme Yayıncılık, Ankara.
- KOMEIMA, K., ROGERS, B.S., LU, L., CAMPOCHIARO P.A. (2006). Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *PNAS*, **103(30)**:11300-11305.
- KONRAD, T., VICINI, P., KUSTERER, K., HOFLICH, A., ASSADKHANI, A., BOHLES, H.J., SEWELL, A., TRITSCHLER, H.J., COBELLI, C., USADEL, K.H. (1999). Alpha-lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **22**: 280-287.
- KOYA, D., HAYASHI, K., KITADA, M., KASHIWAGI, A., KIKKAWA, R., HANEDA, M. (2003). Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol*, **14**:250-253.
- KRAMER, K., HOPPE, P.P. PACKER, L. (2002). Nutraceuticals in health and disease prevention. Erişim: [<http://www.ajcn.org/content/75/4/783.full>]. Erişim Tarihi: 15.04.2010.
- LEE, W.J., LEE, I.K., KIM, H.S., KIM, Y.M., KOH, E.H., WON, J.C., HAN, S.M., KIM, M., JO, I., OH, G.T., PARK, I., YOUN, J.H., PARK, S., LEE, K., PARK. J. (2005). α -Lipoic Acid Prevents Endothelial Dysfunction in Obese Rats via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**:2488-2494.
- LEE, K.S., PARK, H.S., PARK, S.J., KIM, S.R., MIN, K.H., JIN, S.M., PARK, K., KIM, U., KIM, C.Y., LEE, Y.C. (2006). A prodrug of cysteine, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression in asthma. *Mol Pharmacol*, **68**:1281-1290.
- LEE, S.J., KANG, J.G., RYU, O.H., KIM, C.S., IHM, S.H., CHOI, M.G., YOO, H.J., KIM, D.S., KIM, T.W. (2009). Effects of alpha-lipoic acid on transforming growth factor beta1-p38 mitogen-activated protein kinase-fibronectin pathway in diabetic nephropathy. *Metabolism*, **58(5)**:616-623.

- LEFCORT, F., VENSTROM, K., MCDONALD, J.A., REICHARDT, L.F. (1992). Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development*, **116**:767-782.
- LI, X., LIU, Z., LUO, C., JIA, H., SUN, L., HOU, B., SHEN, W., PACKER, L., COTMAND, C.W., LIU, J. (2008). Lipoamide protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*, **44**:1465-1474.
- LI, C., ZHANG, Q., LI, M., ZHANG, J., YU, P., YU, D. (2009). Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. *Chin Med J*, **122(21)**:2580-2586.
- LIN, W., REHFUSS, A., SCHULER, C., LEVIN, R.M. (2008). Effect of coenzyme Q10 and α -lipoic acid on the response of the rabbit urinary bladder to repetitive stimulation and in vitro ischemia. *Urology*, **72(1)**: 214-219.
- LOGAN, A.C., WONG, C. (2001). Chronic fatigue syndrome: oxidative stress and dietary modifications. *Altern Med Rev*, **6(5)**:450-459.
- LOW, P.A., TUCK, R.R. (1984). Effects of changes of blood pressure, respiratory acidosis and hypoxia on blood flow in the sciatic nerve of the rat. *J Physiol*, **347**:513-524.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Clin Chem*, **193**:265-269.
- DVALI, L., MACKINNON, S.E. (2003). Basic Pathophysiology of the Hand, Wrist, and Forearm: Nerve. In: Hand Surgery (Arnold-Peter C Weiss, Richard A Berger, eds). Lippincott Williams & Wilkins.
- MADDUX, B.A., SEE, W., LAWRENCE, J.C. JR., GOLDFINE, A.L., GOLDFINE, I.D., EVANS, J.L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, **50(2)**:404-410.
- MAITRA, I., SERBINOVA, E., TRITSCHLER, H., PACKER, L. (1995). Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Rad Biol Med*, **18**:823-829.
- MATTULAT, A. (1992). Determination of the lipoic acid content of animal tissue. In Thioctic Acid: International Thioctic Acid Workshop. (Edited by Schmidt K. and Ulrich H.) pp. 69-73. Universimed Verlag, Frankfurt am Main.
- McCORD, J.M., FRIDOWICH, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol Chem*, **224**:6049-6055.
- MELHEM, M.F., CRAVEN, P.A., DERUBERTIS, F.R. (2001). Effects of dietary supplementation of alpha-lipoic acid on early glomerular injury in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol*, **12**:124-133.
- MIDAOU, A.E., CHAMPLAI, J.D. (2002). Prevention of Hypertension, Insulin Resistance, and Oxidative Stress by alpha Lipoic Acid. *Hypertension*, **39**:303-307.
- MIJNHOUT, G.S., ALKHALAF, A., KLEEFSTRA, N., BILO, H.J. (2010). Alpha lipoic acid: a new treatment for neuropathic pain in patients with diabetes? *Neth. J Med*, **68(4)**:158-62.
- MITSUI, Y., SCHMELZER, J.D., ZOLLMAN, P.J., MITSUI, M., TRITSCHLER, H.J., LOW, P.A. (1999). Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*, **163**:11-16.

MONOGRAPH. (2006). Alpha Lipoic acid monograph. *Alternative Medicine Review*, **11**:232- 237.

MOORE, K.L., DALLEY. A.F. (2007). Kliniğe Yönelik Anatomi. 4. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

MOREIRA, P.I., HARRIS, P.L.R., ZHU, X., SANTOS, M.S., OLIVEIRA, C.R., SMITH, M.A., PERRY, G. (2007). Lipoic Acid and N-acetyl Cysteine Decrease Mitochondrial-Related Oxidative Stress in Alzheimer Disease Patient Fibroblasts. *Journal of Alzheimer's Disease*, **12**:195-206.

NACAR, A., ÖMEROĞLU, S. (2004). Diyabetik nöropatide periferik sinir hücre dışı matriks yapısı. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, **1**:42-47.

NACAR, A., ELMAS, Ç., ERDOĞAN, D., ÖMEROĞLU, S. (2007). Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda siyatik sinirde laminin, tip 4 kollojen ve fibronektin dağılımlarının immünohistokimyasal olarak incelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **5(3)**:129-134.

ODABASOĞLU, F., HALICI, Z., AYGUN, H., HALICI, M., ATALAY, F., ÇAKIR, A., CADIRCI, E., BAYIR, Y., SULEYMAN, H. (2010). α -Lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *Br J Nutr.*, **15**:1-12.

OH, S.K., YUN, K.H., YOO, N.J., KIM, N., KIM, M., PARK, B., JEONG. J. (2009). Cardioprotective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Myocardial Reperfusion Injury: Suppression of Reactive Oxygen Species Generation and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Korean Society of Cardiology*, **39(9)**:359-366.

OU, P., NOUROOZ-ZADEH, J., TRITSCHLER, H.J., WOLFF, S. (1996). Activation of aldose reductase in rat lens and metalion chelation by aldose reductase inhibitors and lipoic acid. *Free Radic Res*, **25**:337-346.

PACKER, L., WITT, E.H., TRITSCHLER, H.J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biol Med*, **19**:227-250.

PAGLIA, D.E., VALENTINE, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med*, **70**:158-169.

PANKOV, R., YAMADA, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*, **115**:3861-3863.

PARK, S., SEO, S., CHOI, O., PARK, C. (2005). Alpha lipoic acid protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*, **11(31)**:4883-4885.

PATRICK, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*, **11(2)**:114-127.

PATRICK L. (2002). Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev*, **7(6)**:456-471.

PFÄFFLY, J.R. (2001). Lipoic acid: the antioxidant chameleon. Erişim: [<http://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/education/2001/2/PfafflyJ--Paper%202.pdf>]. Erişim Tarihi: 05.05.2010.

PLERING, W.F., BRATANOW, N. (1990). Role of the Clinical Laboratory in Guiding Treatment of Amanita virosa Mushroom Poisoning: Report of Two Cases. *Clin Chem* **36(3)**:571-574.

- PODDA, M., TRITSCHLER, H.J., ULRICH, H., PACKER, L. (1994). Alpha-lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, **204**: 98-104.
- RUCKER, R.B., WOLD, F. (1988). Cofactors in and as posttranslational protein modifications. *FASEB J*, **2**:2252-2261.
- REED, L.J., DE BUSK, B.G., GUNSALUS, I.C., SCHNAKENBERG, G.H.F., (1951). Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, **114**:93-94.
- ROBINSON, L.R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, **23**:863-873.
- RUMMLER, L.S., GUPTA, R. (2004). Peripheral nerve repair. *Curr Opin Orthop*, **15**:215-219.
- SADLER, T.W. (2005). Langman medikal embriyoloji. 9. Baskı, (Çev. Ed. Başaklar, A.C.). Palme Yayınevi, Ankara.
- SALONEN, J.T., NYSSNEN, K., TUOMAINEN, T.P., MENP, P.H., KORPELA, H., KAPLAN, G.A., LYNCH, J., HELMRICH, S.P., SALONEN, R. (1995). Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *Br Med J*, **311**:1124-1126.
- SCHOLICH, H., MURPHY, M.E., SIES, H. (1989). Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochim Biophys Acta*, **1001**(3):256-261.
- SEN, C.K., PACKER, L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, **72**:653-669.
- SENA, C.M., NUNES, E., LOURO, T., PROENCA, T., FERNANDES, R., BOARDER, M.R., SEICA, R.M. (2008). Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *Br J Pharmacol*, **153**(5):894-906.
- SENOGLU, M., NACITARHAN, V., KURUTAS, E.B., SENOGLU, N., ALTUN, I., ATLI, Y., OZBAG, D. (2009). Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*, **4**:22.
- SIDDONS, R.C., MILLS, C.F. (1981). Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *Br J Nutr*, **46**:345-355.
- SINET, P.M., HEIKKILA, R.E., COHEN, G. (1980). Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J Neurochem*, **34**: 1421-1428.
- SMITH, A.R., VISIOLI, F., FREI, B., HAGEN, T.M. (2008). Lipoic acid significantly restores, in rats, the age-related decline in vasomotion. *British Journal of Pharmacology*, **153**:1615-1622.
- SNELL, E.E., STRONG, F.M., PETERSON, W.H. (1937). Growth factors for bacteria. *Biochem J*, **31**:1789-1799.
- SNELL, R.S. (2004). Klinik Anatomi. 6. Baskı, Tavşalı Matbaacılık, İstanbul.
- SOLA, S., MIR, M.Q.S., CHEEMA, F.A., KHAN-MERCHANT, N., MENON, R.G., PARTHASARATHY, S., KHAN, B.V. (2005). Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome. *Circulation*, **111**:343-348.

SRINIVASA, R.D., SRINIVAS, P., BALASUBRAHMANYAM, D., IQBAL, J. (2007). Synthesis of an oxalipoic acid. *Tetrahedron Letters*, **48(26)**:4533-4534.

STACEY, E.M. (2004). Histology for pathologists. 3rd ed. Lippincott Williams&Wilkins, 245-248.

STREEPER, R.S., HENRIKSEN, E.J., JACOB, S., HOKAMA, J.Y., FOGT, D.L., TRITSCHLER, H.J. (1997). Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. *Am J Physiol*, **273**:185-191.

SUN, Y., OBERLEY, L.W., YING, L. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, **34**:497-500.

SUNG, M.J., KIM, W., AHN, S.Y., CHO, C., KOH, G.Y., MOON, S., KIM, D.H., LEE, S., KANG, K.P., JANG, K.Y., PARK, S.K. (2005). Protective effect of alpha lipoic acid in lipopolysaccharide induced endothelial fractalkine expression. *Circ Res*, **97**: 880-890.

TAKEUCHI, Y., MIYAMOTO, T., KAKIZAWA, T., SHIGEMATSU, S., HASHIZUME, K. (2007). Insulin autoimmune syndrome possibly caused by alpha lipoic acid. *Intern Med*, **46(5)**:237-239.

TANER, D. (2005). Fonksiyonel Nöroanatomi. 5. Baskı, ODTÜ Yayıncılık, Ankara.

TAV, R.Ç. (2008). Diyabetli Sıçanlarda Koenzim Q10 ve Alfa Lipoik Asit Desteklerinin Egzersizle Oluşan Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

TAYLOR, G.I., GIANOUTSOS, M.P., MORRIS, S.F. (1994). The neurovascular territories of the skin and muscles: Anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg*, **94(1)**:1-36.

TEICHERT, J., PREISS, R. (1995). Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B*, **672**:277-281.

THOMAS, P.K., LANDON, D.N., KING, R.H.M. (1984). Disease of peripheral nerves. In: Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW (Eds). Greenfield's Neuropathology, 4th Ed. London: Edward Arnold, 807-921.

TUTTLE, K.R., ANDERBERG, R.J., COONEY, S.K., MEEK, R.L. (2009). Oxidative stress mediates protein kinase C activation and advanced glycation end product formation in a mesangial cell model of diabetes and high protein diet. *Am. J. Nephrol.*, **29(3)**:171- 180.

VARLI, K. (2005). Periferik sinir yaralanmalarında elektronöromiyografi. *Türk Nöroşirurji dergisi*, **15(3)**:202-205.

VOLOBOUEVA, L.A., LIU, J., JUNG, H.S., AMES, B.N., MILLER, S.S. (2005). (R)- α -Lipoic Acid Protects Retinal Pigment Epithelial Cells from Oxidative Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46(11)**:4302-4310.

WAMBI, C., SANZARI, J., WAN, X.S., NUTH, M., DAVIS, J., KO, Y.H., SAYERS, C.M. BARAN, M., WARE, J.H., KENNEDY, A.R. (2008). Dietary Antioxidants Protect Hematopoietic Cells and Improve Animal Survival after Total-Body Irradiation. *Radiat Res*, **169(4)**:384–396.

YAPAR, S.B. (2006). Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi. Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi.

ZEMBRON-LACNY, A., SLOWINSKA-LISOWSKA, M., SZYGULA, Z., WITKOWSKI, K., SZYSZKA, K. (2009). The comparison of antioxidant and hematological properties of N-acetylcysteine and alpha-lipoic acid in physically active males. *Physiol Res*, **58(6)**:855-861.

ZIEGLER, D., MOVSESYAN, L., MANKOVSKY, B., GURIEVA, I., ABYLAIULY, Z., STROKOV, I. (2009). Treatment of symptomatic polyneuropathy with actovegin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, **32(8)**:1479-1484.

ZIEGLER, D., HANEFELD, M., RUHNAU, K.J., MEIGNER, H.P., LOBISCH, M., SCHTITTE, K., GRIES, F.A. (1995). Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha lipoic acid. *Diabetologia*, **38**:1425-1433.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ozan TURAMANLAR

Doğum Yeri ve Tarihi: Uşak – 02.07.1975

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Okul/Üniversite	Yıl
Lisans ve Y. Lisans	Tıp	Uludağ Üniversitesi / Bursa	2000
Lise	-	Tevfik Sırrı Gür Lisesi / Mersin	1992
Ortaokul	-	Balıkesir Ortaokulu / Balıkesir	1989
İlkokul	-	Dumlupınar İlkokulu / Balıkesir	1986

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Aile Hekimi	Afyonkarahisar Sinanpaşa Merkez 3 No'lu A.S.M	2010-....
Tabip	Afyonkarahisar Sinanpaşa Sincanlı Devlet Hastanesi	2007-2010
Tabip	Afyonkarahisar Sinanpaşa Güney Sağlık Ocağı	2005-2007
Tabip	Erzincan 1 Nolu Acil Sağlık Hizmetleri İstasyonu	2003-2005
Tabip	Erzincan Üzümlü Merkez Sağlık Ocağı	2001-2003
Tabip	Erzincan İliç Merkez Sağlık Ocağı	2001

Yabancı Dil: İngilizce

Katıldığı Kurslar:

- “Aile Hekimliği 1. Aşama Uyum Eğitimi”, 05 – 11 Haziran 2008, Afyonkarahisar
- “Hasta Hakları ve Sağlık Çalışanlarının Hukuki Sorumlulukları”, 09 Kasım 2007, Afyonkarahisar
- “Computer Use In Anatomical Presentations”, 26 – 29 Ekim 2007, Denizli
- “Acil Serviste İntihar Girişimlerine Psikososyal Destek ve Krize Müdahale Programı”, 08-06-2007, Afyonkarahisar
- “UMKE Temel Eğitimi”, 14 – 20 Mayıs 2007, Afyonkarahisar
- “Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Tedavi Yöntemleri” 7 – 8 Aralık 2006, İzmir
- “Basic Course in Laboratory Animals Science”, 25 – 26 Kasım 2006, Kayseri

- “Klinik ve Deneysel Çalışmalarda Stereolojik Yöntemler”, 27 – 29 Haziran 2006, Afyonkarahisar
- “İleri Yaşam Desteği Kursu”, 19 – 21 Ekim 2005, Adana
- “Sağlık Bakanlığı Acil Hekimliği Sertifika Programı Temel Modülü”, 03 – 07 Ekim 2005, Afyonkarahisar
- “Onkolojik Nöropatolojisi Kursu”, 19 – 20 Haziran 2004, İzmir
- “24. Travma ve Resusitasyon Kursu”, 11- 14 Mayıs 2004 Ankara
- “Toksikolojide Temel İlkeler ve Acil Tedavi Yaklaşımları”, 12 – 16 Nisan 2004, Ankara

Katıldığı Kongreler:

- “Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Anatomi Kongresi”, 28 Ekim – 1 Kasım 2010, Kıbrıs
- “Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Anatomi Kongresi”, 29 Ekim – 1 Kasım 2008, Mersin
- “Uluslararası Katılımlı 11. Ulusal Anatomi Kongresi”, 26 – 26 Ekim 2007, Denizli
- “Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Anatomi Kongresi”, 6 – 10 Eylül 2006, Bodrum

Projelerde Yaptığı Görevler:

- Rat Siyatik Sinir İskemi-Reperfüzyon Hasarına Alfa-Lipoik Asit’in Koruyucu Etkisi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi, 09.TIP.12, Araştırmacı, 2009.
- Anatomi Pratik Derslerinde Öğrenci Performanslarının Değerlendirilmesi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi, 06.TIP.05, Araştırmacı, 2006.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

- Anatomi ve Klinik Anatomi Derneği
- Türk Tabipler Birliği

ESERLER**Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:**

1. Turamanlar O, Kırpıko O, Haktanir A, Ozen OA. A case of schizencephaly. 10th Congress of European Association of Clinical Anatomy (EACA),September 2-9,P-218 İstanbul, Turkey, 2009.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- Turamanlar O, Özen OA, Akçer S, Toktaş M. “Modern anatominin kurucularından: Hasan Mazhar Paşa”. Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Anatomi Kongresi”, Kıbrıs, 28 Ekim – 1 Kasım 2010.

- Turamanlar O, Doğan FA, Değirmenci B, Songur A. “Sol pulmoner arter agenezisi olgusu”. Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Anatomi Kongresi”, Kıbrıs, 28 Ekim – 1 Kasım 2010.

- Ozan Turamanlar, Oğuz Kırpıko, Oğuz Aslan Özen, Murat Sancaktar. “Hastalık Teşhisinde Fizik Muayene ve Radyolojik Tanı Yöntemlerinin Önemi: Çoklu Patolojili Meningoensefalosel Olgusu” 53. Milli Pediatri Kongresi, Marmaris, 21 - 25 Ekim 2009.

- Turamanlar O, Kırpıko O, Özen OA, Değirmenci B, Akçer S, Uygur R. “Vena hepatica media yokluğu ile birlikte retroaortik vena renalis: çok nadir bir olgu sunumu” 12.Ulusal Anatomi Kongresi, Mersin, 2008.

- Özen OA., Turamanlar O., Kırpıko O., Songur A., Eser O., “Sıradışı Bir Sinus Sagittalis Superior Bifurkasyon Varyasyonu Olgusu” 11.Ulusal Anatomi Kongresi, Denizli, 2007; VIII. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi “Deneyden Kliniğe” / Bolu, 2009.

- Bas O, Ozen OA., Songur A., Akçer S., Turamanlar O. “A Case of Bifid Reversed Palmaris Longus Muscle” 10.Ulusal Anatomi Kongresi, Bodrum, 2006.

Sosyal Faaliyetler:

- Eskrim Milli Takım Doktoru, 2010.
- Masa Tenisi İl Hakemi ve Lisanslı sporcu,
- Atletizm İl Hakemi,
- Badminton Aday Hakemi.