



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**NORMOKSİK VE İSKEMİK KOŞULLARDA İNKÜBE EDİLEN  
SIÇAN KORTİKAL DİLİMLERİNİN TTC İLE BOYANMASI:  
İNKÜBASYON KOŞULLARININ BOYANMA ÜZERİNE ETKİSİ**

Ecz. ZÜLFİYE GÜL

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2017





T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**NORMOKSİK VE İSKEMİK KOŞULLARDA İNKÜBE EDİLEN  
SIÇAN KORTİKAL DİLİMLERİNİN TTC İLE BOYANMASI:  
İNKÜBASYON KOŞULLARININ BOYANMA ÜZERİNE ETKİSİ**

**Ecz. Zülfiye GÜL**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof.Dr. Rifat Levent BÜYÜKUYSAL**

**Uludağ Üniversitesi BAP: HDP (T)-2014/33**

**BURSA-2017**

**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum

“Normoksik ve iskemik koşullarda inkübe edilen sıçan kortikal dilimlerinin TTC ile boyanması: İnkübasyon koşullarının boyanma üzerine etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Ecz. Zülfiye GÜL**  
**Tarih ve İmza**

26.10.2017



## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE


Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Zülfiye GÜL tarafından hazırlanan "Normoksik ve iskemik koşullarda inkübe edilen sıçan kortikal dilimlerinin TTC ile boyanması: İnkübasyon koşullarının boyanma üzerine etkisi" konulu Doktora tezi 26/10/2017 günü, 11:00 -12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

### Adı-Sovadı


### İmza

#### Tez Danışmanı

Üye Prof. Dr. R. Levent Büyükuysal



Üye Prof. Dr. Vahide Savcı



Üye Prof. Dr. Kasım Özlük



Üye Prof. Dr. Güner Ulak



Üye Prof. Dr. Kevser Erol



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ali Aydoğdu  
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

26/10/2017

**Adı Soyadı:** Zülfiye GÜL

**Anabilim Dalı:** Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


**Tez Konusu:** Normoksik ve iskemik koşullarda inkübe edilen sıçan kortikal dilimlerinin TTC ile boyanması: İnkübasyon koşullarının boyanma üzerine etkisi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**DANIŞMAN ONAYI**

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. R. Levent Büyükuysal

**İmza:**



## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deneysel Bir Model Olarak Beyin Dilimlerinin Kullanılması .....	3
2.2. Beyin Dilimleri Üzerinde Doku Hasarı Oluşturmak Amacı ile Kullanılan Deneysel Modeller .....	6
2.2.1. İskemi-Reperfüzyon Modeli .....	6
2.2.2. Hidrojen Peroksid Modeli .....	8
2.2.3. FeSO <sub>4</sub> + Askorbik Asit Modeli .....	9
2.2.4. Menadion Modeli .....	10
2.3. Beyin Dilimleri İnkübasyon Modelinde Hasar Büyüklüğünü Ölçmek Amacı ile Sıklıkla Kullanılan Parametreler .....	11
2.3.1. TTC Boyaması .....	11
2.3.2. Malondialdehid (MDA) .....	13
2.3.3. ROS .....	15
2.3.4. Laktat dehidrogenaz (LDH) .....	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Beyin dilimlerinin hazırlanması ve inkübasyonu .....	17
3.2. TTC Boyaması .....	19
3.3. Laktat dehidrogenaz ölçümü .....	20
3.4. MDA Ölçümü .....	20
3.5. ROS Ölçümü .....	21
3.6. Total protein ölçümü .....	21
3.7. Veri analizi .....	21

<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>22</b>
4.1. İnkübasyon ortam hacmi sabit, ancak dilim sayısı farklı normoksik inkübasyon koşullarının TTC boyanması, dilimlerden LDH salıverilmesi, doku MDA ve ROS düzeyleri üzerine etkisi .....	22
4.2. Ortamdaki dilim sayısının iskemi ve reperfüzyon hasarının büyüklüğüne etkisi ....	24
4.3. Dilimlerin TTC ile boyanması üzerine inkübasyon hacmindeki artışın veya inkübasyon süresinin etkisi .....	27
4.4. Ortamdaki dilim sayısının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , FeSO <sub>4</sub> + Askorbik asit ve Menadion ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi .....	28
4.4.1. Ortamdaki dilim sayısının H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif stres hasarı büyüklüğüne etkisi .....	28
4.4.2. Ortamdaki dilim sayısının FeSO <sub>4</sub> + Askorbik asit ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi .....	31
4.4.3. Ortamdaki dilim sayısının Menadion ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi .....	33
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>36</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>46</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>56</b>
<b>9. TEŞEKKÜR</b> .....	<b>57</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>58</b>

## TÜRKÇE ÖZET

### **Normoksik ve İskemik Koşullarda İnkübe Edilen Sıçan Kortikal Dilimlerinin TTC İle Boyanması: İnkübasyon Koşullarının Boyanma Üzerine Etkisi**

**Amaç:** Deneysel iskemi ve benzeri durumlarda meydana gelen beyin hasarının büyüklüğünün doğru bir şekilde gösterilmesi, hasar mekanizmasının açıklanması ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. İnfarkt alanının belirlenmesi amacı ile en fazla tercih edilen yöntemlerden biri beyin kesitlerinin 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) ile boyanmasıdır. Ancak, değişik deneysel prosedürler kullanılması ile bu boyamada farklı sonuçlar elde edildiği literatürde görülmektedir. Biz bu çalışmayı; inkübasyon ortamındaki dilim sayısının TTC boyama yoğunluğu üzerine etkisini ve bunun hasarlanma ile ilgili diğer parametreler için de söz konusu olup olmadığını incelemek amacıyla planladık.

**Metod:** Dişi Sprague Dawley sıçanlardan hazırlanan kortikal dilimler (0,4 mm) 2 ml inkübasyon ortamına 1,3,6 dilim olacak şekilde yerleştirildiler. 60 dakikalık preinkübasyon periyodundan sonra dilimler normoksik koşullar yanında, in vitro iskemi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), FeSO<sub>4</sub> (0,1 mM) + askorbik asid veya menadion (1 mM) içeren 4 farklı oksidatif stres modellerinde inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda dilimler %0,5 TTC ile boyandı. Doku hasarının tespiti için aynı deney koşullarında, ortama salıverilen LDH yanında, doku MDA ve ROS düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Normoksik koşullarda inkübe edilen dilimlerin TTC boyanma yoğunluğunun ortamdaki dilim sayısı arttıkça fazlaştığı gözlemlendi. Benzer şekilde hasarlanma ile ilgili diğer parametreler de dilim sayısı artışından olumlu etkilendi. Dört farklı oksidatif stres modeli ile indüklenen TTC boyanma yoğunluğundaki azalma, 1 dilim inkübe edilen grupta en yüksek iken 6 dilim içeren grupta bu azalma anlamlılık düzeyine ulaşmadı. Doku MDA ve ROS düzeyleri ile ortama salınan LDH düzeylerindeki değişikliklerin de, TTC boyanma yoğunluğundaki değişikliklerle yüksek derece korelasyon gösterdiğini tespit edildi.

**Sonuç:** Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, inkübasyon ortamındaki dilim sayısının, normoksik ve oksidatif stres koşullarda deney sonuçlarını etkileyebileceğini açıkça göstermektedir. Bu etkinin mekanizmasını tez çalışması kapsamında çalışılmamış



olmakla birlikte, etkinin inkübasyon ortamına salınan endojen nöroprotektif maddelerin konsantrasyonlarındaki değişiklik ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar sözcükler:** İn vitro iskemi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Menadion, TTC boyaması, ROS



## İNGİLİZCE ÖZET

### **Staining of the Rat Cortical Slices with 2,3,5 Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) either in Normoxic and Ischemic Conditions: Effect of Incubation Conditions on Staining Of The Slices**

**Objective:** The accurate quantitation of tissue damage produced under in vivo or vitro conditions is important to the investigation of injury mechanisms and therapies. Although 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), a marker of the mitochondrial enzyme activity, is widely used to assess the effects of cerebral ischemia, many controversial results, probably due to experimental models used, are easily seen in the literature. In present study we aimed to demonstrate whether number of the brain slices in the medium alters their staining intensities with TTC and if present, whether changes in the other parameters related to tissue damage also show a close similarity under in vitro conditions.

**Methods:** 1, 3, 6 cortical slices (0.4 mm) prepared from female Sprague Dawley rats were placed into the incubation plates containing 2 ml oxygenated physiological medium. After 60 min of preincubation period, cortical slices were incubated either in normoxic or four different oxidative stress conditions; namely in vitro ischemia or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (1 mM), FeSO<sub>4</sub> (0.1 mM) + ascorbic acid or menadione (1 mM) models. At the end of each oxidative stress models, slices were stained with 0.5% TTC. Tissue MDA and ROS levels and the leakage of LDH into the medium were also studied for determination of the tissue damage occurred under these experimental conditions.

**Results:** When incubated in normoxic medium, staining intensities of the slices were highly correlated with the number of slices in the medium. Similarly, other parameters related to tissue damage were also affected in a positive way by the increasing the slice number in the medium. Whereas all oxidative stress models used here caused significant declines in TTC staining intensities in one slice containing group, neither in vitro ischemia nor other models-induced declines reach to statistically significant level in six slices containing group. Alterations in LDH leakage from the slices and tissue MDA ROS levels, on the other hand, were found to be highly correlated with the changes observed in TTC staining intensities.

**Conclusion:** These results clearly indicate that experimental conditions such as slices quantity or incubation volume significantly alters the results observed under normoxic or ischemia-like conditions. Although the mechanism(s) remained to be determined, increasing the slice quantity or decreasing the incubation volume probably causes an increase in the concentration of endogenous substance(s) in the medium which are probably involved in neuroprotection as seen in present study.

**Key words:** In vitro ischemia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadione, TTC staining, ROS



## 1. GİRİŞ

Deneysel iskemi ve benzeri durumlarda meydana gelen beyin hasarının büyüklüğünün doğru bir şekilde gösterilmesi, hasar mekanizmasının açıklanması ve bu hasara karşı yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi açısından son derece önemlidir. İnfarkt alanının belirlenmesi amacı ile en fazla tercih edilen yöntemlerden bir tanesi beyin kesitlerinin 2, 3, 5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) ile boyanmasıdır. Normalde renksiz olan TTC canlı dokudaki mitokondrilerde süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından kırmızı-pembe renkli formazan'a dönüştürülmektedir. Kesitlerin fotoğraflanması ve değişik analiz yöntemleri ile boyanan alanların büyüklüğünün belirlenmesi ile veya kırmızı formazan bileşiğinin dokudan geri alınıp yoğunluğunun dansitometrik olarak ölçülmesi ile infarkt alanının büyüklüğü saptanabilmektedir.

İskemi ve benzeri koşulların beyin dilimlerinde dopamin, glutamat ve diğer aminoasitlerin salıverilmesi ve LDH çıkışı üzerine olan etkileri anabilim dalımızda uzun zamandır çalışılan konuların başında gelmektedir. Son olarak yaptığımız ve yayınladığımız bir çalışmada da iskeminin neden olduğu doku hasarı üzerine alfa keto asitlerin ve glutamatın koruyucu etkileri TTC boyama yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Demircan ve ark., 2013). Bu çalışmalar esnasında gözlediğimiz "inkübasyon ortamındaki dilim sayısı arttıkça dilimlerin TTC ile boyanabilirliklerinin arttığı" yönündeki ön bulgularımız bu tez çalışmasının çıkış noktasını oluşturmuştur.

Bu çalışma yukarıda belirtilen bu ön bulgulardan hareketle;

1) İn vitro beyin dilimleri inkübasyon çalışmalarında TTC boyanabilirliği açısından optimum deney koşullarını ortaya koymak,

2) TTC boyanma yoğunluğu ile; a) doku hasarının bir göstergesi olan dilimlerden LDH çıkışı arasında, b) doku hasarlanmasından öncelikle sorumlu tutulan serbest oksijen radikallerinin (ROS) düzeyleri arasında ve c) lipid peoksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeyleri arasında bir korelasyon olup olmadığını göstermek,

3) TTC ile boyanma yoğunluğu onların yaşayabilirliğini veya mitokondrial enerji üretiminin sürdürüldüğünü gösteren bir parametre olduğuna göre, ortamdaki

dilim sayısı artışının farklı oksidatif stres modellerinin neden olduğu hasar büyüklüğünü değiştirip değiştirmediğini göstermek ve bu değişikliğin biyokimyasal bulgularla paralel olup olmadığını ortaya koymak amacı ile planlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Deneysel Bir Model Olarak Beyin Dilimlerinin Kullanılması

Beyin dilimlerinin in vitro deneysel çalışmalarda kullanımını yaklaşık 75 yıl önce anaerobik glikolizisin neden olduğu doku fosfat dağılımındaki değişikliklerin tavşan beyin dilimlerinde incelendiği çalışma ile başlamıştır (Giffen Macfarlane and Weil-Malherbe, 1940). Takip eden yıllarda, beyin dilimlerinin hazırlanmasında kullanılan dilimleyiciye de adını veren McIlwain tarafından beyin dilimleri üzerinde santral sinir sisteminin metabolizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Buchel ve McIlwain, 1950; McIlwain ve Cheshire, 1950). Hipokampustan elde edilen dilimlerin normal sinaptik aktivitelerini sürdürebildiklerinin gösterilmesinden sonra, beyinin çeşitli bölgelerinden elde edilen dilimlerin in vitro deneysel bir model olarak kullanılması giderek yaygınlaşmıştır (Nagerl ve ark., 2004; Galimberti ve ark., 2006). Nörotransmitter sentez ve salıverilmesinin incelenmesinden, reseptör sonrası olayların kantite edilmesine, enzim aktivitesi ve protein sentez hızlarının ölçümünden, yapısal değişikliklerin saptanabilmesine kadar hemen bütün biyokimyasal, farmakolojik, fizyolojik, morfolojik ve histopatolojik değişikliklerin bu model üzerinde çalışılabilmesi mümkündür (Pringle ve ark., 1996; Ray ve ark., 2000; Cho ve ark., 2004;).

Beyin dilimlerinde olduğu gibi, vücut dışına çıkartılan ve uygun bir fizyolojik ortam içine alınarak üzerinde çalışılan doku veya organların kullanıldığı in vitro yöntemlerin, in vivo yöntemlerle kıyaslandığında bazı dezavantajları yanında, üstünlükleri de söz konusudur (Lein ve ark., 2011). İn vitro yöntemlerin başlıca dezavantajları şunlardır:

- 1) Fizyolojik-sinirsel-hormonal bağlantılarının kesilmiş olması.
- 2) Doku bütünlüğünün bozulması.
- 3) Dekapitasyon ve dokunun dilimlenmesi esnasında meydana gelen olası hasarlanma ve bu hasarlanmanın çalışma sonuçlarına etkisinin tam olarak kestirilememesi.

4) Dolaşımında bulunan birçok endojen madde veya faktörün dilimlerin içine alındığı ve deneyin sürdürüldüğü fizyolojik sıvı içinde bulunmaması ve dilimlerin bu endojen maddelerin olası faydalı/zararlı etkilerinden yoksun bırakılmış olması.

Yukarıda özetlenmeye çalışılan bu dezavantajlara karşın, in vitro yöntemlerin in vivo yöntemlerle karşılaştırıldığında üstünlükleri de söz konusudur (De Simoni ve Yu, 2006). Bu üstünlükler;

1) Kullanılan fizyolojik sıvının kimyasal-gaz karışımının ve sıcaklığının tamamen araştırmacının kontrolünde olması.

2) Kan-beyin bariyerinin olmaması nedeni ile dilimlerin bulunduğu ortama eklenecek ilaçların direkt doku ile temas etmesi.

3) İn vivo koşullarda olduğu gibi direkt etkiyi baskılayacak refleks mekanizma veya aktivasyonların bulunmaması.

4) İn vivo çalışmalarda kullanılan anestezi maddelerinin olası olumsuz etkilerinin söz konusu olmaması.

5) Kısa sürede fazla sayıda veri elde edilmesine olanak sağlaması.

Beyin dilimlerinin hazırlanması ve kullanılması ile ilgili iki farklı yöntem söz konusudur; bunlardan bir tanesi “*acute brain slices*” olarak nitelendirilen ve yetişkin deney hayvanı beyinlerinden hazırlanan dilimlerin kullanıldığı yöntemdir. Söz konusu bu yöntemde dilimler, perfüzyon ve/veya inkübasyon koşullarında 6-8 saat kadar yapısal bütünlüklerini koruyabildikleri için, ancak bu sürelerle sınırlı deneysel çalışmalarda kullanılmaya olanak sağlarlar (Fukuda ve ark., 1995). Hücre kültür çalışmalarında olduğu gibi beyin dilimi kültürlerinin kullanıldığı model ise (*organotypic brain slice culture*), 3–9 günlük deney hayvanlarının beyinlerinden elde edilen dilimlerin uygun ortamlarda günlerce, bazen haftalarca kültür edilmesine olanak sağlayan deneysel bir modeldir (Buchs ve ark., 1993; Bahr, 1995). Söz konusu modelde yetişkin olmayan beyin kullanılmasının nedeni, hazırlanan dilimlerdeki nöronal plastisite hızının çok yüksek olması yanında, gelişimini tamamlamamış beyin dokusunun dilimlemenin neden olduğu travmatik hasara karşı daha fazla direnç göstermesidir (Del Rio ve ark., 1991; Muller ve ark., 1993).

Akut beyin dilimleri modelinin en önemli avantajı, hazırlanmasının kolay olması, deneysel işlemin saatler içinde bitirilebilmesi, elektrofizyolojik çalışmalara uygun olması ve kısa süre sürede fazla veri elde edilebilmesine olanak sağlamasıdır (Colbert, 2006). Diğer taraftan, nöronal plastisite hızının yüksek olması, değişik işaretleme teknikleri sonrası nöronal ve glial hücre görüntülerinin elde edilebilmesi, özellikle nörodejenaratif ve nöro-gelişimsel alanda beyin dilimleri kültürlerinin kullanılmasını yaygınlaştırmıştır (Buskila ve Amitai, 2010; Khurana ve Li, 2013). İskemik hasarlanma, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejenaratif hastalıkların mekanizmalarının aydınlatılması ve bunlara karşı yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi amacı ile beyin dilimleri sıklıkla kullanılan deneysel modeller arasında önemli bir yer almaktadır (Corse ve ark., 1999; Hsia ve ark., 1999; Sherer ve ark., 2003).

Yukarıda belirtildiği gibi, akut beyin dilimlerinin hazırlanması yüksek bir teknoloji gerektirmemekle birlikte, elde edilen sonuçların tutarlılığı veya tekrar edilebilirliği açısından dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar da söz konusudur. Aşağıda maddeler halinde sıralanan bu noktalar tezin son bölümünde daha etraflı bir şekilde tartışılacaktır.

- 1) Kullanılan deney hayvanının dekapite edilmesi ve beyin dilimlerinin hazırlanarak oksijenlendirilmiş ve soğutulmuş fizyolojik sıvı içine alınması arasında geçen süre,
- 2) Hazırlanan beyin dilimlerinin kalınlığı,
- 3) Dilimlerin perfüze veya inkübe edildiği ortamın sıcaklığı,
- 4) Deneysel prosedüre başlamadan önce hazırlanan dilimlerin preinkübasyon dönemine alınması,
- 5) Dilimlerin perfüzyonu mu, yoksa inkübasyonu mu? Birbirlerine üstünlükleri?



## **2.2. Beyin Dilimleri Üzerinde Doku Hasarı Oluşturmak Amacı ile Kullanılan Deneysel Modeller**

Doku hasarlanmasına neden olan mekanizmaları aydınlatmak ve hasarlanmaya karşı yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek amacı ile farklı deneysel modeller kullanılmaktadır (Elliot ve Wolfe, 1962; Lipton 1999). Burada sadece bu tez kapsamında kullanılan deneysel modellerden ve hasarlanma ile ilgili ileri sürülen mekanizmalarından kısaca bahsedilmiştir.

### **2.2.1. İskemi-Reperfüzyon Modeli**

İskemi, kanlanmanın bozulmasına bağlı olarak bir doku veya organın oksijen, glikoz ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır (Grace, 1994). Beyin iskemisi tromboz, emboli veya diğer nedenlerle kan akımının azalması ya da tamamen kesilmesi sonucu meydana gelir. Kan akımının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu oksijen ve glikoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlarda zedelenmeyle sonuçlanan bir seri olaylar gerçekleşir (Woolf, 1992). İskemi süresinin uzaması ile hücredeki hasar geri dönüşümsüz olur ve hücrelerin bütünlüğü kaybolarak hücrel ölüm gelişir.

İskemi ile hücrede ilk etkilenen olay mitokondrial oksidatif fosforilasyondur ve bunun sonucunda adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatinin sentezinde azalma meydana gelir. Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (De Groot ve Rauen, 2007). İskeminin devam etmesi, hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikmesine, asidozda artışa ve enzim ve proteinlerin hasarlanmasına yol açar (Grace, 1994; De Groot ve Rauen, 2007).

ATP düzeyindeki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum-kalsiyum- klorür artışına ikincil hücrel şişmeyle sonuçlanır (Kumar ve ark., 1994).

Mitokondrilerde aşırı vakuolizasyon, hücre zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle iskemik alanın yeniden kanlanması durumunda hücre içi aşırı kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) tutulumu ile birlikte geri dönüşümsüz hasar kaskadı aktive olur. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacakları metabolitleri kaybeder ve pH'ın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesine ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya geçmesine yol açar (Hearse ve ark., 1978, Kristian ve Seisjo, 1998). Bu enzimler sitoplazma ve çekirdek içi yapıların sindirimine neden olur. Sonuçta ölü hücreler myelin biçimler ve fosfolipidlerden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite edilir veya yağ asitlerine parçalanırlar (Hearse ve ark., 1978; Sattler ve Tymianski, 2000).

Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma da aktive olur. Nükleer faktör-kappaB (NF- $\kappa$ B) aktivasyonu sonucu inflamasyon araçlarının ve adezyon moleküllerinin (özellikle ICAM-1 ve E-selektin) sentezinde artış olur ve bu artış, lökosit adezyonunu artırır (Vinten-Johansen, 2004; Frangogiannis, 2007). Oksijen nitrik oksid (NO) sentezi için de gerekli olduğundan, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Endotel tarafından sentezlenen NO miktarındaki bu azalma vazokonstriksiyona neden olur. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve platelet aktive edici faktör (PAF) sentez artışı gerçekleşir. Sonuç olarak iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir (Seekamp ve ark., 1993; Dambrosio ve ark., 2001).

İskemik dokuya kesilmiş olan kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon), hücre hasar kaskadının aktive olmasına bağlı olarak paradoksal olarak doku hasarına yol açar. İskemi/reperfüzyon (I/R), özellikle myokardiyal ve serebral infarktüslerde doku hasarına katkıda bulunması açısından oldukça önemlidir. I/R hasarının fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olmakla beraber, reperfüzyon sırasında dokuda düzeyi artan serbest oksijen radikallerinin (ROS), I/R hasarından önemli ölçüde sorumlu olduğu genellikle kabul edilmektedir. Süperoksit anyonlar ( $O^{\cdot -}$ ), hidroksil radikalleri ( $OH^{\cdot}$ ), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksitten türeyen peroksinitrit, reperfüzyon esnasında meydana gelen başlıca ROS ürünleridir (Li ve Jackson, 2002; Rodrigo ve ark., 2005). Meydana gelen ROS

ürünleri, hücre membranında lipid peroksidasyonuna, DNA parçalanmasına, sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak protein parçalanmasının artmasına ve enzimatik aktivite kaybına yol açarlar. Bu hücrelerde oksidan ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulmuş olması da, artan ROS oluşumunun neden olduğu hücre hasarı daha da artırır (Neumar, 2000; Miki ve ark., 2003).

İn vivo beyin İ/R hasarı modellerinde, beynin o bölgesindeki orta serebral arterde belirli süre oklüzyon yapılarak bölgenin kanlanması kesilir ve sonrasında bu oklüzyon ortadan kaldırılarak bölgenin kanlanması yeniden sağlanarak reperfüzyon oluşturulur. Beyin dilimlerinin kullanıldığı in vitro beyin İ/R modelinde ise, beyin dilimleri preinkübasyon periyodu sonrasında oksijen ve glikoz içermeyen fizyolojik ortama alınarak iskemi oluşturulur. Bu dönem sonunda dilimlerin tekrar oksijen ve glikoz içeren ortama alınması ile reperfüzyon gerçekleştirilir (Lipton, 1999).

### **2.2.2. Hidrojen Peroksid Modeli**

Elektronlar atom veya molekülde genellikle eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle moleküller stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Bu özellikleri nedeniyle serbest radikaller kolaylıkla hücre bileşenleri ile reaksiyona girebilir ve onların kimyasal yapılarını değiştirerek bu yapılarda hasar oluşturabilirler (Slater, 1984; Nakamura ve ark., 2001). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, santral sinir sistemi hastalıklarından epilepsi, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok hastalığın oluşumunda rol oynadıkları gösterilmiştir (Slater, 1984; Burcak ve Andican, 2004).

Serbest radikaller organizmada metabolizma sırasında endojen olarak sürekli oluşabildiği gibi radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar ile eksojen olarak da ortaya çıkabilirler. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile  $O^{2-}$  radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile  $H_2O_2$  radikali oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif  $OH$  radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır (Slater, 1984; Philips, 1994).

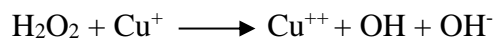
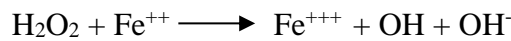
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> güçlü bir radikal olduğu için, in vitro çalışmalarda ROS modellemesi amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır (Desagher ve ark., 1997; Gul ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda in vitro beyin dilimleri inkübasyon sisteminde 0,05 – 1 mM dozları arasında inkübasyon ortamına eklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, doku ROS düzeyi ile lipid peroksidasyonun göstergesi olan doku malondialdehid (MDA) düzeyini doza bağlı olarak arttırdığı ve doku canlılığının göstergesi olan TTC boyanma yoğunluğunu ise azalttığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2006; Fatehi-Hassanabad ve Tasker, 2011; Gul ve ark., 2016).

### 2.2.3. FeSO<sub>4</sub> + Askorbik Asit Modeli

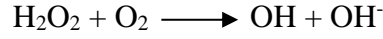
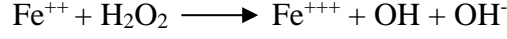
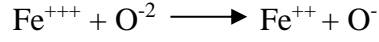
Serbest radikaller organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrelerin hemen tüm kısımlarında membrana bağlı veya serbest halde bulunan birçok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre membranına bağlı NADPH oksidaz ve lipoksigenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir (Slater, 1984; Philips, 1994).

ROS'lar, molekülün yapısına göre, oksijen merkezli (süperoksit radikali, peroksit radikali, hidroksil radikali, vb.), karbon merkezli (karbon tetraklorür, aromatik hidrokarbonlar) veya sülfür merkezli (glutatyon radikali) olarak gruplandırılabilir (Slater, 1984; Samokyszyn ve ark., 1989; Philips, 1994).

O<sup>-2</sup> radikali en çabuk ve en kolay oluşan radikaldir. Aktivitesi kısmen düşük olmasına karşın diğer radikalleri oluşturduğu için önemlidir. OH<sup>-</sup> radikali bu grupta en güçlü ROS'dur ve oluşması için ortamda demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığı gerekmektedir. Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar Fenton reaksiyonları olarak bilinir (Freeman ve Crapo, 1982; Philips, 1994; Slater, 1984).



O<sup>-2</sup> radikali, bir geçiş metalinin varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tepkimeye girerek OH<sup>-</sup> radikalini oluşturur. Bu da Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinir (Freeman ve Crapo, 1982; Philips, 1994).



Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir.

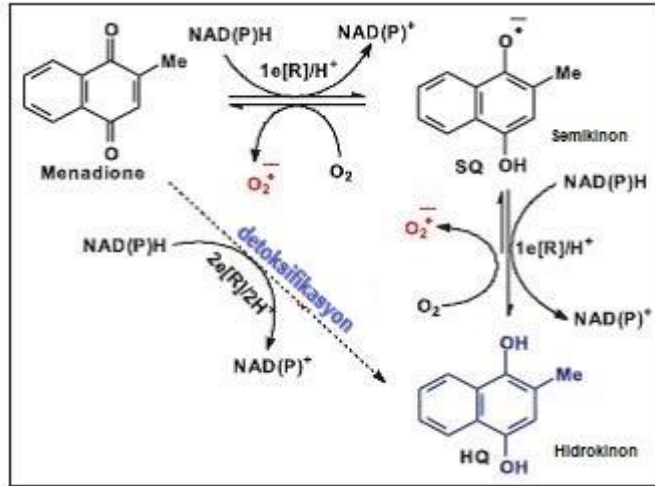
Beyin dilimleri inkübasyon sisteminde veya hücre kültürü çalışmalarında, bu reaksiyonlar ile ROS oluşturmak için “FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit” karışımı sıklıkla kullanılan bir modeldir. Askorbik asit, inkübasyon ortamına eklenen demirin +2 değerlikli iyon halinde kalmasını sağlayarak, Fenton reaksiyonu ile doku veya hücrelerde OH<sup>-</sup> radikali oluşmasına neden olur (Samokyszyn ve ark., 1989; Thomas ve ark., 1985).

#### 2.2.4. Menadion Modeli

Beyin dilimleri inkübasyon sisteminde ROS'un etkisini test etmek için kullanılan diğer bir madde de menadiondur. ROS oluşturucu etkisi olan ve bu amaçla sıkça kullanılan menadion (2-metil-1,4-naftakinon, menafton, K3 vitamini), sentetik olarak elde edilen ve yağda çözünen en basit yapılı K vitamini türüdür (Abe ve Saito, 1996; Criddle ve ark., 2006; Kossenjans ve ark., 1996).

Menadionun metabolizması sırasında, 1 elektron indirgeyici enzimler, önce stabil olmayan bir semikinon radikali oluşturur ve bunu daha sonra stabil hidrokinona indirgerler; moleküler oksijen varlığında ise semikinon ve hidrokinon metabolitlerinin yeniden oksidasyonu ROS oluşmasına neden olur (Criddle ve ark., 2006; Nath ve ark., 1995). Bu nedenle menadionla inkübe edilen dilimlerin daha sonra menadionsuz

normoksik ortama nakledilmesi ROS üretimine yol açabilir. Gerçekten de Desagher ve arkadaşları (1997), menadionun  $H_2O_2$  oluşturduğunu, hatta bu bileşiğin inkubasyon ortamından uzaklaştırılması sonrasında bile  $H_2O_2$  oluşumunun devam ettiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, endotel hücrelerinde yapılan in vitro bir çalışmada, menadion ile oluşturulan oksidatif stres hasar modelinde, menadiona maruz kalmakla superoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin arttığı gösterilmiştir (Kossenjans ve ark., 1996). Anabilim Dalımızda yapılan bir diğer in vitro çalışmada da, beyin dilimlerinin menadion ile inkübe edilmesinin herhangi bir etkiye neden olmadığı, ancak bu dilimlerin menadion içermeyen oksijenlendirilmiş fizyolojik ortama alınmaları sonrası, dilimlerden protein S100B ve LDH çıkışlarının arttığı ve TTC boyanmasının azaldığı bulunmuştur (Demircan ve ark., 2014).



Şekil 1. Menadionun reaktif oksijen radikalleri oluşumundaki olası mekanizması (Nath ve ark., 1995).

## 2.3. Beyin Dilimleri İnkübasyon Modelinde Hasar Büyüklüğünü Ölçmek Amacı ile Sıklıkla Kullanılan Parametreler

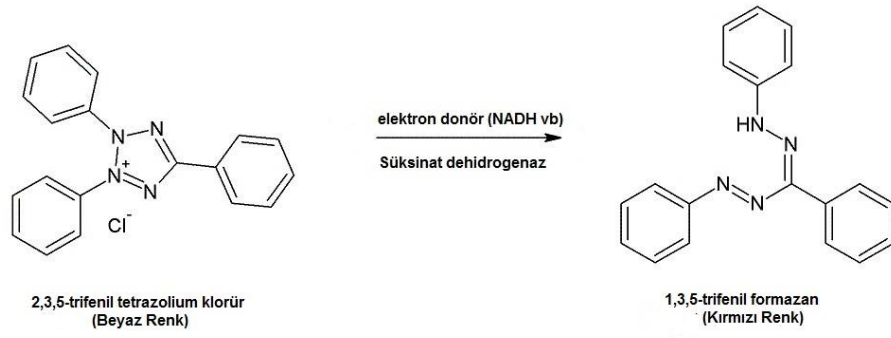
### 2.3.1 TTC Boyaması

İn vivo veya in vitro iskemi-reoksijenasyon modellerinde meydana gelen hasarın büyüklüğünü kantite etmek amacı ile değişik histopatolojik boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan yöntemleri başında, dokuların hematoksilin-eozin (H&E) ile veya 2, 3, 5-trifenil tetrazolium klorür (TTC) ile boyanması gelmektedir (Goldlust ve ark, 1996; Isayama ve ark, 1991; Yang ve ark.,

1998). Bederson (1986) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hasar alanı tespiti açısından, TTC ve H&E boyamasının yakın korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. H&E boyamasına göre, oldukça ucuz ve kolay olan, fakat aynı zamanda hızlı sonuç alınabilen TTC boyama yöntemi, serebral hasar alanın belirlenmesinin yanı sıra, myokard ve diğer dokulardaki hasar büyüklüğünün tespitinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Denizot ve Lang, 1986; Hussain ve ark., 1993; Varming ve ark., 1996).

Suda kolay çözünen ve normalde renksiz olan TTC, canlı dokudaki mitokondrilerde, bir proton alıcısı gibi davranarak süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından kırmızı-pembe renkli formazan'a dönüşmektedir (Altman, 1974; Bederson ve ark., 1986; Bednar ve ark., 1994; Belayev ve ark., 1999; Cole ve ark., 1990). Kesitlerin fotoğraflanması ve değişik analiz yöntemleri ile boyanan alanların büyüklüğünün belirlenmesi ile (Huang ve ark., 2008; Swarnkar ve ark., 2010) veya kırmızı formazan bileşiğinin dokudan geri alınıp yoğunluğunun dansitometrik olarak ölçülmesi ile (Gul ve ark., 2016; Xue ve ark., 2004) infarkt alanının büyüklüğü saptanabilmektedir.

İskemide, hasar kaskadının mitokondrilerde enerji metabolizmasının bozulmaya başlamasıyla indüklendiği birçok araştırmacı tarafından öne sürülmektedir. TTC, mitokondriyal disfonksiyonu ortaya koyan bir boyama olduğundan primer hasarı gösteren bu parametre ile, doku hasarını gösteren diğer parametreler arasındaki korelasyon oldukça önemlidir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, TTC boyamasının, kristal viyole (Tureyen ve ark., 2004) ve oldukça sık kullanılan hematoksilen-eozin (Mathews ve ark., 1999; Okuno ve ark., 2001) boyamasıyla paralel sonuçlar ortaya koyduğu ve doku hasarını göstermede en az bu parametreler kadar spesifik bir boyama olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Sadece hasarlı hücre zarına sahip hücreleri boyayan propidium iyodür boyaması ile TTC boyamasının doku hasarını gösterme konusunda paralel sonuçlar gösterdiği bilgisi de literatürde mevcuttur (Swarnkar ve ark., 2010). Ayrıca hasarın bir başka göstergesi olan dokudan LDH çıkışı ile TTC boyaması arasında yakın bir korelasyon olduğu araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Huang ve ark., 2008; Xue ve ark., 2004).



Şekil 2: TTC'nin hücre içine alındıktan sonra renkli formazon bileşiğine dönüştürülmesi (Bederson ve ark., 1986).

Konu ile ilgili çalışmalara bakıldığında, hasar büyüklüğünü saptamak amacı ile kullanılan TTC çözelti yoğunluğunun büyük farklılıklar gösterdiği ve yoğunluğu %1-%5 arasında değişen TTC çözeltilerinin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Bederson ve ark., 1986; Bose ve ark., 1988; Goldlust ve ark., 1996). Joshi (2004) ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, %0,05'lik TTC çözeltisinin, hasarlı ve normal dokular arasında en iyi kontrastı oluşturduğu ve böylece hasarın tespit edilmesinde en uygun çözelti olabileceği ortaya konmuştur. TTC yoğunluğunda olduğu gibi, çözeltinin hazırlanmasında hangi çözücünün kullanılacağı konusunda da bir görüş birliği söz konusu değildir. Distile su (Yanamoto ve ark., 2001), %0,9 NaCl (Relton ve ark., 2001; Sandritter ve Jestadt, 1958) veya fosfat tamponu (Goldlust ve ark., 1996; Li ve ark., 2000) en sık kullanılan çözücülerin başında gelmektedir. Yine Joshi (2004) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fosfat tamponun, dokuların TTC ile boyanması için en uygun çözücü olduğu vurgulanmıştır.

### 2.3.2. Malondialdehid (MDA)

Hücre membranında akışkanlığı sağlamak için, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) içerisinde çoklu doymamış yağ asitleri fazla miktarda bulunur (Dekkers, 1996; Gotes ve ark., 1990). Serbest radikaller, hücrenin lipid membranından elektron yakalayarak lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan serbest radikal atağını başlatırlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağını hedef alan radikaller, karbon ve hidrojen arasındaki bağı zayıflatarak lipid hidroperoksitlerinin oluşmasına neden olur. Peroksidize olmuş çoklu doymamış yağ asitlerinin en önemli ikincil



oksidasyon ürününden biri MDA'dır (Blokhina ve ark., 2003; Suttar ve ark., 1997). Çeşitli hastalıklarda görülen MDA artışının, serbest radikallerin verdiği hasar ile ilişkili olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur ve lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (GuttarLidge, 1995; Suttar ve ark., 1997).

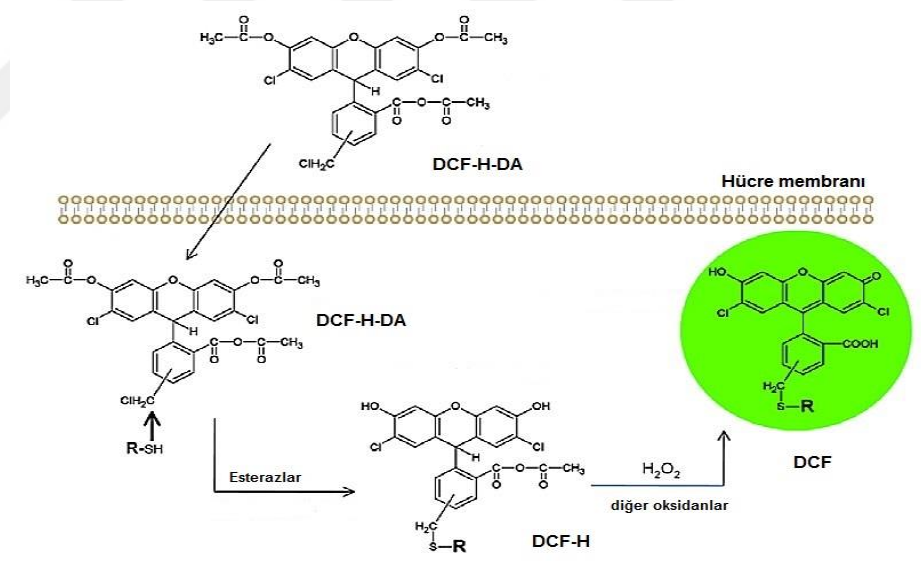
MDA'nın 100 °C de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonrası oluşan tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler (TBARS) genellikle spektrofotometrik yöntemle ölçülürler (GuttarLidge, 1995). Ancak, TBA'nın MDA'nın yanı sıra karbonhidratlar, pigmentler, aminoasitler ve piridinler gibi birçok bileşikle de reaksiyona girebilmesi nedeniyle bu metod fazla güvenilir bulunmamaktadır (Chirico,1994; Guillen-Sans ve Guzman-Chozas, 1998). Diğer taraftan, 2TBA-MDA kompleksinin fluoressans (Volpi ve Tarugi, 1998) veya UV-vis dedektör (Mateos ve ark., 2005) bağlantılı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile de ölçülebilmesi mümkündür. Ancak, MDA ile TBA'nın reaksiyonu için gerekli olan yüksek sıcaklık (95-100<sup>0</sup>C) ve kuvvetli asidik koşullar (pH 1,5-3,5) örneklerde bulunabilen antioksidanların da peroksidasyona uğramalarına neden olur. Bu olumsuzluklarına rağmen günümüzde TBARS ölçümü, hala insan (Sjodin ve ark., 1990; 54-56) ve hayvan (Mateos ve ark., 2005; Sans ve ark., 1995) çalışmalarında plazma, karaciğer, akciğer ve böbrek gibi dokulardaki MDA düzeylerinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Alternatif olarak, MDA'nın 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile inkübasyonu sonucu meydana gelen hidrazon türevinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ölçülmesinin, MDA için çok daha spesifik olduğu ileri sürülmüştür. (Mateos ve ark., 2004; Zelzer ve ark., 2013; Blokhina ve ark., 2003; Mateos ve ark., 2004; Moreira ve ark., 2010). Bu tez çalışmasında doku MDA düzeyleri söz konusu bu yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

### **2.3.3. ROS**

ROS, genellikle kullanılan moleküler probun serbest radikaller tarafından yükseltgenmesi esasına dayanan metotlarla ölçülmektedir. Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) (Ghiselli ve ark., 1995; Glazer, 1990), toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) (Delange ve ark., 1989; Wayner ve ark., 1985) gibi bu esasa

dayanan metodlarda, peroksil radikali  $ROO^{\cdot}$  ve hedef molekül arasındaki reaksiyon sonucu prob yükseltgenir ve yükseltgenmiş prob, özelliğine göre spektrofotometrik veya florimetrik yöntemlerle ölçülür (Huang ve ark., 2005; Ou ve ark., 2001). Bu çalışmada, temel prensibi aynı olan, Valkonen ve Kuusi (1997) tarafından geliştirilen ve peroksi radikalleri için yükseltgenebilir bir prob olan 2,7- diklorofloresin-diasetat'ın (DCFH-DA) kullanıldığı yöntem kullanılmıştır. DCFH-DA floresans özelliği olmayan bir maddedir. Ancak hücre içine girdiğinde buradaki esterazlar tarafından diasetat bağı koparılarak 2,7-diklorodihidrofloresin'e (DCFH) dönüştürülür. Meydana gelen bu ürün de peroksi radikalleri tarafından yükseltgenerek 2,7-diklorofloresin'e (DCF) dönüştürülür. DCF yüksek floresans özellik gösteren bir bileşiktir ( $\lambda_{eksitasyon}=480$  nm ve  $\lambda_{emisyon}=526$  nm), fakat aynı zamanda 504 nm'de absorbanansa da sahiptir. Bu yüzden meydana gelen DCF, ya florimetrik olarak ya da spektrofotometrik olarak ölçülebilir. (Hammes ve ark., 2005).



Şekil 3: DCFH-DA'nın hücre içine alındıktan sonra floresans özelliğe sahip DCF- bileşiğine dönüştürülmesi (Valkonen ve Kuusi, 1997) .

### 2.3.4. Laktat dehidrogenaz (LDH)

LDH, glikolitik yolakta rolü olan sitoplazmik bir enzim olup laktat ve piruvatın birbirlerine dönüşmesini katalize eder (Skillen, 1984). Hipoksi, iskemi, nekroz,

neoplastik hastalıklar, bakteriyel toksinlere maruziyet, dehidratasyon, hemoliz, kimyasal maddelerle zehirlenmeler gibi hücre hasarı veya ölümüne yol açan durumlarda, permeabilitesi bozulmuş hücre membranından geçerek stoplazmadan ekstrasellüler aralığa çıkar. Bu nedenle hücre hasarı veya ölümünün büyüklüğünü ortaya koymak amacı ile sıklıkla kullanılır (Skillen, 1984; Valentovic ve Ball, 1998).

LDH aktivitesinin belirlenmesinde laktatın pirüvata dönüşüm reaksiyonu kullanılmaktadır. Bu reaksiyonda LDH, L-laktatın pirüvata çevrilmesini,  $\text{NAD}^+$  molekülünün hızla  $\text{NADH}$  molekülüne indirgenmesiyle birlikte katalizler. LDH aktivitesi,  $\text{NAD}^+$  molekülünün  $\text{NADH}$  molekülüne çevrilmesi sırasında zamana bağlı olarak absorbansta gözlenen değişikliklerle orantılıdır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyaller

TTC boyamasında kullanılan 2, 3, 5-trifenil-tetrazolyum, MDA ölçümünde türevlendirme için kullanılan dinitrofenilhidrazin, ROS ölçümünde kullanılan 2,7 diklorofloresin-diasetat ve albumin Sigma Chem Co firmasından (St. Louis, MO, USA), LDH kiti Biolabo Sa (Maizy, France) firmasından temin edilmiştir. Krebs solüsyonu hazırlamada kullanılan kimyasallar ile diğer kimyasallar Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, FR) veya Merck firmalarından temin edilmiştir.

#### 3.2 Beyin dilimlerinin hazırlanması ve inkübasyonu

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 3 aylık, ağırlığı 250-300 gr olan dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Tüm deneysel protokol için Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı (Karar no: 2013-17/06). Çalışma sırasında hayvan etik kurallarına uygun olarak deneyde kullanılan hayvan sayısını azaltmak ve hayvanların acı çekmesini en aza indirmek için azami çaba gösterildi.

Deney Büyükuysal'ın (2005) beyin dilimlerinde, daha önceden kullandığı iskemi-reoksijenasyon modeline göre yapıldı. Sıçanlar dekapite edildikten sonra beyinleri hızla çıkartıldı ve önceden soğutulmuş, %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılmış fizyolojik Krebs çözeltisi içine alındı (Krebs çözeltisinin kompozisyonu: 120 mmol/L NaCl, 1,3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 mmol/L KCl, 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> ve 10 mmol/L glikoz). Daha sonra hızlı bir şekilde korteks disseke edildi ve doku dilimleyicisine (McIlwain) yerleştirilerek 0,4 mm kalınlığında dilimlendi. Dilimlenmiş doku, içinde soğuk ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvı bulunan petri kabına alınarak dilimler fırça yardımıyla birbirinden ayrıldı. Dilimler fırça yardımıyla oksijenlenmiş fizyolojik çözelti içeren inkübasyon odacıklarına yerleştirildi. Odacıklardaki inkübasyon hacmi ve dilim sayısı deney protokolüne göre ayarlandı. İnkübasyon odacıkları 37°C'deki su banyosuna yerleştirildi ve dilimler 60 dakika süresince denge periyoduna alındı (preinkübasyon dönemi). Bu dönem

boyunca, 10 dakikada bir dilimlerin inkübe edildikleri ortam, önceden ısıtılmış ve oksijenlendirilmiş taze Krebs çözeltisi ile değiştirildi. Deney planı ve preinkübasyon dönemi ardından uygulanan deneysel prosedürler aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

*1: İnkübasyon ortam hacmi sabit, ancak dilim sayısı farklı inkübasyon koşulu:*

Hazırlanan kortikal dilimler 2 ml'lik inkübasyon ortamlarına, her bir ortamda artan sayıda dilim olacak şekilde (1, 3 ve 6 dilim) yerleştirildi. Preinkübasyon dönemi ardından bütün dilimler, 37 °C'de 30 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu dönem sonunda dilimler odacıklardan alındı ve TTC boyaması, doku MDA, ROS ve total protein düzeylerinin ölçümü için kullanıldı. İnkübasyon ortamları ise dilimlerden salıverilen LDH düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

*2: Ortamdaki dilim sayısının iskemi- reoksijenasyonun neden olduğu doku hasarı büyüklüğüne etkisi:*

İnkübasyon ortamlarına (2 ml) artan sayılarda (1, 3 ve 6) yerleştirilen dilimler 60 dakikalık preinkübasyon dönemi ardından oksijen ve glikoz içermeyen ortama alındı ve bu ortamda 30 dakika inkübe edildi (iskemik dönem). Bu dönemin sonunda bütün dilimler oksijen ve glikoz içeren ortama alınarak 30 dakika daha inkübe edildi (reoksijenizasyon dönemi; REO). REO dönemi sonunda inkübasyon ortamları dilimlerden salıverilen LDH miktarını ölçmek için kullanılırken, dilimler ise TTC boyaması, doku MDA, ROS ve protein düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

*3: Dilimlerin TTC ile boyanması üzerine inkübasyon hacmindeki artışın veya inkübasyon süresinin etkisi:*

İnkübasyon hacmi ile ilgili çalışmalarda, kortikal dilimler 2, 6 veya 12 ml Krebs içeren inkübasyon odacıklarına, her odada 3 dilim olacak şekilde yerleştirildi. Preinkübasyon dönemi ardından dilimler 30 dakika kontrol veya oksijen ve glikoz içermeyen ortamda inkübe edildi. Bu dönemin sonunda bütün dilimler 30 dakika daha normoksik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Bu dönemin sonunda bütün dilimler TTC boyaması için kullanıldı.

İnkübasyon süresinin TTC boyanması üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarda ise, kortikal dilimler 2 ml Krebs içeren inkübasyon odacıklarına 1, 3 veya 6 dilim olacak şekilde yerleştirildi. Preinkübasyon dönemi ardından dilimler, 15, 30 veya 60 dakika boyunca kontrol veya oksijen ve glikoz içermeyen ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından dilimler 15, 30 veya 60 dakika daha normoksik koşullarda imkübeye edildi. Bu dönem sonunda bütün dilimler TTC boyanması için kullanıldı.

*4: Ortamdaki dilim sayısının  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$ + askorbik asit veya menadion ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi:*

İnkübasyon ortamlarına artan sayılarda (1, 3 ve 6) dağıtılan dilimler 60 dakikalık preinkübasyon dönemi ardından 1mM  $H_2O_2$  veya 0,1 mM  $FeSO_4$ + askorbik asit (20  $\mu$ M ) içeren ortama alındı bu koşullarda 60 dakika imkübeye edildi. Bu inkübasyon dönemi sonunda ortam dilimlerden salıverilen LDH miktarını ölçmek için kullanılırken, dilimler ise TTC boyanması, doku ROS, MDA ve total protein düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

Menadionun neden olduğu oksidatif stres hasarı menadion sonrası dönemde çok daha belirgin olduğu için (Demircan ve ark., 2004; Kossenjans ve ark., 1996), menadion çalışmasında dilimler önce 30 dakika süre ile 0,1 mM menadion içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından bütün dilimler menadion içermeyen oksijenlenmiş ortama alınarak 30 dakika daha imkübeye edildi. Bu dönemin sonunda inkübasyon ortamı dilimlerden salıverilen LDH miktarını ölçmek için kullanıldı. Dilimler ise TTC boyanması, doku ROS, MDA ve total protein düzeylerinin ölçümü için kullanıldı.

### **3.3 TTC Boyanması**

İnkübasyon sonunda dilimler 2 ml %0,5 TTC çözeltisi (0,1 M sodyum fosfat tamponu içinde; pH 7,4) içine alındı ve 60 dakika 37°C’de karanlık su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Boyanma sonrası TTC çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldı ve dilimler soğuk Krebs ile yıkandı. Bazı deneylerde, boyama işlemi ardından, fotoğraflarını çekmek amacı ile dilimler %4’lük formaldehid içine alınırken,

deneylerin büyük bir kısmında dilimlerdeki boyanma yoğunluğu spektrofotometrik yöntemle ölçüldü (Joshi ve ark., 2004). Bu amaçla boyanmış dilimler 2 ml etanol-DMSO (1/1; v/v) içine alındı ve 24 saat boyunca karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda etanol-DMSO içine geçen dokudaki kırmızı formazan bileşiğinin yoğunluğu 490 nm dalga boyunda okutuldu ve bu değerler dilimlerde ölçülen total protein değerlerine göre düzeltildi. Dilimlerdeki TTC boyanma yoğunluğu optik dansite (OD)/mg protein şeklinde verildi.

### 3.4 LDH ölçümü

Dilimlerden inkübasyon ortamına salıverilen LDH miktarı ticari bir kit kullanılarak (Biolabo Sa, Maizy, France) spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. İnkübasyon ortamı (50 µl) 0,6 ml LDH reaksiyon çözeltisiyle karıştırıldı ve karışımın absorbansı 37°C'de, birer dakika ara ile iki defa 340 nm'de ölçüldü. LDH aktivitesi bu iki absorbans değeri arasındaki farka göre hesaplandı ve daha sonra dilimlerin protein düzeylerine göre düzeltildi. Dilimlerden salıverilen LDH miktarı  $\Delta$ OD/mg protein şeklinde verildi. Absorbans ölçümlerini etkilediği için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> modellerinde, LDH ölçümü yapılamadı.

### 3.5 MDA Ölçümü

Dilimlerdeki MDA düzeyleri dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile türevlendirme sonrası yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ölçüldü (Mateos ve ark., 2004; Zelzer ve ark., 2013). Dilimler 0,5 ml %1'lik sülfürik asid içinde homojenize edildikten sonra, 200 µl homojenata 20 µl DNPH (5 mM; 2M HCl ile hazırlandı) ilave edildi. Türevlendirme amacı ile örnekler 24 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Örneklerin 10,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesi sonrası, 10 µl süpernatant HPLC sistemine enjekte edildi.

HPLC sisteminde analitik ayırım ODS 2 C<sub>18</sub> kolon kullanılarak yapıldı (5 µm partikül büyüklüğü, kolon uzunluğu ve çapı 125 x 4 mm). Sistemde mobil faz olarak %0,2 (v/v) asetik asid içeren asetonitril-distile su (38: 62; v/v) karışımı kullanıldı. Sistemin akış hızı HP 1100 series pompa kullanılarak 1 ml/dakikaya ayarlandı. Örneklerdeki MDA'nın hidrazon türevi 310 nm dalga boyunda Jasco UV-975 UV dedektör kullanılarak saptandı. Örneklerin pik boyları MDA standartlarının pik boyları

ile karşılaştırılarak hidrazon türevinin miktarı hesaplandı. MDA standardı olarak, 0,1 M HCl içinde hazırlanan 1.1.3.3 tetraetoksipropan çözeltisi kullanıldı. Dilimlerdeki MDA değerleri total protein düzeylerine göre düzeltildi ve pmol/mg protein şeklinde verildi. DNFH ile MDA ölçümünü etkilediği için Menadion modelinde, MDA ölçümü yapılamadı.

### **3.6 ROS Ölçümü**

Doku ROS düzeyleri 2,7 diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) kullanılarak ölçüldü (Hammes ve ark., 2005). DCFH-DA, iskemi-reoksijenasyon modelinde reoksijenasyon döneminde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> modellerinde ise bu maddeler ile birlikte ortama eklendi (DCFH-DA son konsantrasyonu 5 µM). Menadion çalışmasında ise, menadion inkübasyonunu takip eden menadionsuz 30 dakikalık dönemde ortama DCFH-DA eklendi. İnkübasyon dönemleri sonunda dilimler soğuk distile su içine alınarak homojenize edildi. Örneklerin 10.000 rpm'de santrifüj edilmesi sonrası üst fazlardaki floresans yoğunluğu Jasco FP-750 spektrofluorometre kullanılarak ölçüldü (eksitasyon: 488 nm; emisyon: 525 nm). Ölçülen yoğunluk değerleri doku protein düzeylerine göre düzeltildi ve doku ROS düzeyleri floresans indeks (FI)/mg protein şeklinde verildi.

### **3.7 Total protein ölçümü**

Çalışmalarda ölçülen bütün parametreler total doku proteinine oranlanarak verildi. Total doku protein düzeyi ölçülecek örnekler 0,4 N HClO<sub>4</sub> içinde sonikatör yardımıyla homojenize edildi. Doku protein düzeyleri Lowry (1951) ve arkadaşlarının yöntemine göre, 50 µl'lik doku homojenatı kullanılarak ölçüldü. Protein standartları koyun serum albümini kullanılarak 0,4 N HClO<sub>4</sub> içinde hazırlandı ve doku örnekleriyle birlikte çalışıldı.

#### **3.7. Veri analizi**

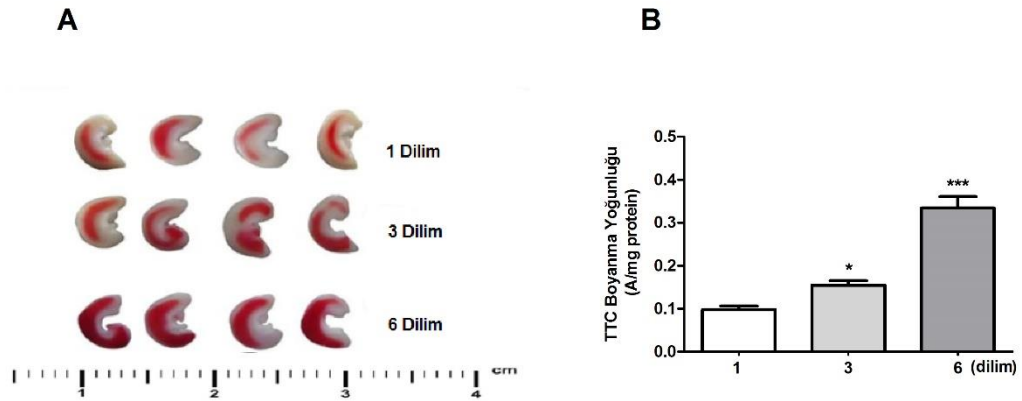
Çalışmada elde edilen değerler ortalama ± standart hata şeklinde verildi ve sonuçların anlamlılığı one-way ANOVA varyans analizi sonrası Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  değeri anlamlı farklılık olarak kabul edildi.



## 4 BULGULAR

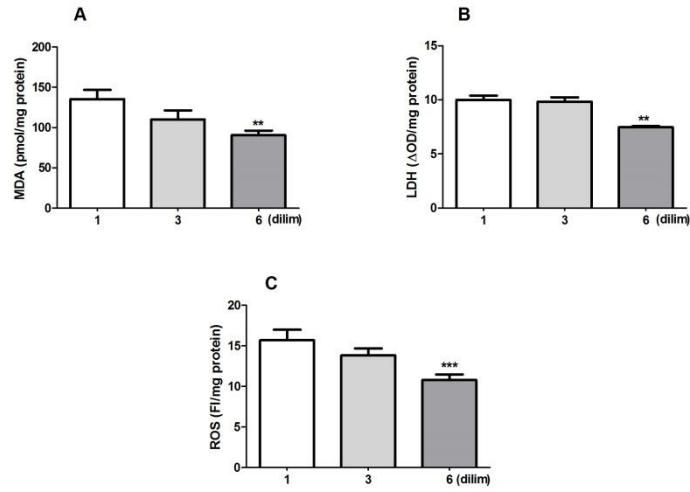
### 4.1 İnkübasyon ortam hacmi sabit, ancak dilim sayısı farklı normoksik inkübasyon koşullarının TTC boyanması, dilimlerden LDH salıverilmesi, doku MDA ve ROS düzeyleri üzerine etkisi

Oksijen ve glikoz içeren normoksik (kontrol) bir ortamda 30 dakika boyunca inkübe edilen dilimlerin TTC ile boyanma yoğunluğu, inkübasyon ortamındaki dilim sayısına bağlı olarak artma gösterdi. İnkübasyon ortamında 1 dilim varken elde edilen boyanma yoğunluğu  $0,087 \pm 0,008$  A/mg protein ölçülürken, bu değer 3 dilim varken  $0.155 \pm 0.026$  A/mg proteine  $p<0,05$ ), 6 dilim varken ise  $0.334 \pm 0.026$  A/mg proteine yükseldi ( $p<0,001$ ; Şekil 1). Dokuların TTC ile boyanma yoğunluğu doku hasarının bir göstergesi veya dilimleri canlılığını gösterdiğine göre, elde edilen bu bulgular, inkübasyon ortamındaki dilim sayısı artışının, 30 dakikalık inkübasyon süresince doku hasarını azalttığını veya dilimlerin canlılığı üzerine olumlu etki gösterdiğini ifade etmektedir.



**Şekil 4:** Normoksik koşullarda inkübasyon ortamındaki dilim sayısının TTC boyanma yoğunluğu üzerine etkisi. Kortikal dilimler 2 ml'lik inkübasyon ortamı içine 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirildiler. 60 dakikalık preinkübasyon dönemi ardından dilimler 30 dakika boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldılar. Bu dönemin sonunda dilimler TTC ile boyandı. Boyama işlemi sonrası dilimlerin bir kısmı, fotoğraflarının çekilmesi amacı ile %5'lik formaldehid içine alındı (Şekil 4A). Dilimlerin kalan kısmında ise TTC boyanma yoğunluğu Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil 4B; \*  $p<0,05$ ; \*\*\*  $p<0,001$ , bir dilme göre anlamlı derecede farklı).

Doku hasarının diğer bir göstergesi olan ve bu amaçla sıklıkla kullanılan lipid peroksidasyon ürünü olan doku MDA düzeylerinin de, inkübasyon ortamındaki dilim sayısı arttıkça anlamlı derecede düştüğü gözlemlendi (Şekil 5A). 30 dakika boyunca 2 ml'lik ortamda tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerdeki MDA değeri  $135,4 \pm 11,3$  pmol/mg protein bulunurken, dilim sayısı altıya çıktığında bu değer  $90,5 \pm 5,7$ 'ye düştüğü gözlemlendi ( $p < 0,01$ ). MDA düzeylerindeki azalmada olduğu gibi, hasarlı dokulardan inkübasyon ortamına salınan LDH miktarı da, ortamdaki dilim sayısındaki artışa paralel olarak azaldı (Şekil 5B). TTC boyanma yoğunluğu, MDA ve LDH değişiklikleri ile uyumlu olarak, hasarlanmadan sorumlu olabilecek parametrelerden biri olan doku ROS düzeylerinin, inkübasyon ortamındaki dilim sayısı arttıkça azaldığı gözlemlendi; böylece ortamda tek bir dilim varken doku ROS düzeyi  $15,71 \pm 1,3$  FI/mg protein iken, bu değer ortamda 3 veya 6 dilim varken sırası ile  $13,84 \pm 0,9$  ve  $10,79 \pm 0,7$  FI/mg protein düzeylerine düştü (sırası ile  $p > 0,05$  ve  $p < 0,01$ ; Şekil 5C).

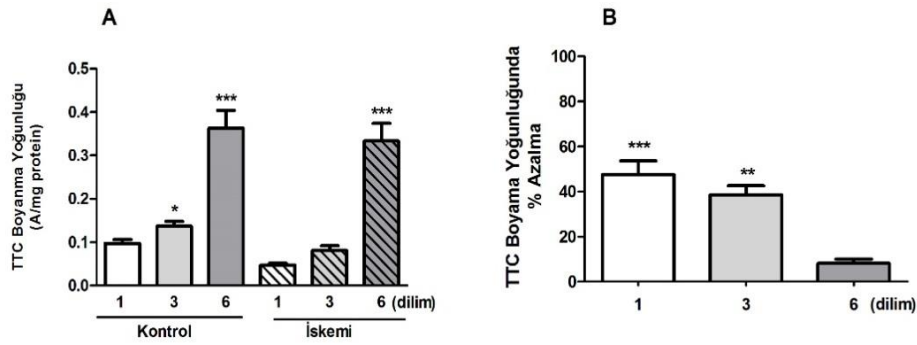


Şekil 5: Normoksik koşullarda inkübasyon ortamındaki dilim sayısının doku MDA düzeyi, dilimlerden LDH çıkışı ve doku ROS düzeyi üzerine etkisi (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , bir dilime göre anlamlı derecede farklı).

#### 4.2 Ortamdaki dilim sayısının iskemi ve REO hasar büyüklüğüne etkisi

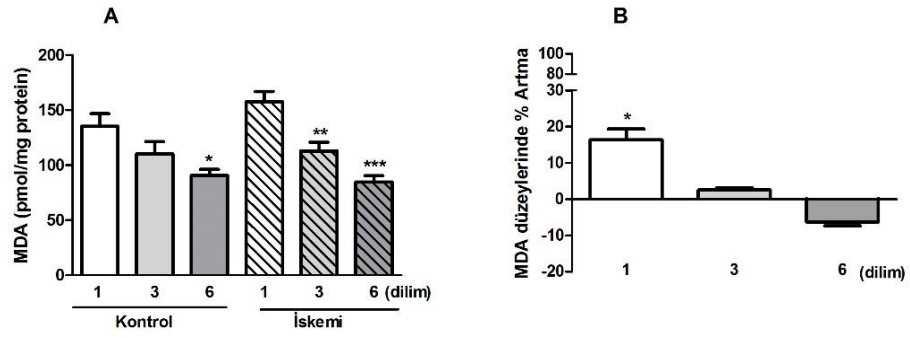
Materyal ve Metod kısmında belirtildiği gibi in vitro iskemi ve REO, preinkübasyon dönemi sonrasında kortikal dilimlerin 30 dakika boyunca glikoz ve oksijen içermeyen ortamda inkübasyona bırakılmaları (iskemi) ve ardından bu

dilimlerin yine 30 dakika süre ile oksijen ve glikoz içeren bir ortamda inkübe edilmeleri ile gerçekleştirildi (reoksijenizasyon REO). İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde 30 dakikalık iskemi-REO sonrasında TTC boyanma yoğunluğu  $47,58 \pm 6,0$  oranında azaldı ( $p < 0,001$ ). İnkübasyon ortamındaki dilim sayısı üçe çıkartıldığında bu değer  $38,64 \pm 4,2$ 'ye düşerken ( $p < 0,01$ ), dilim sayısının altıya çıkartılması kortikal dilimleri hemen tamamen iskemi-REO'nun neden olduğu TTC boyanma yoğunluğundaki azalmaya karşı korudu (azalma oranı  $8,12 \pm 2,3$ ;  $p > 0,05$ ). İskemi-REO sonrası kortikal dilimlerdeki TTC boyanma yoğunlukları ve dilim sayısının boyanma yoğunluğu üzerine etkisi ile ilgili bulgular Şekil 6A ve Şekil 6B'de verilmiştir.



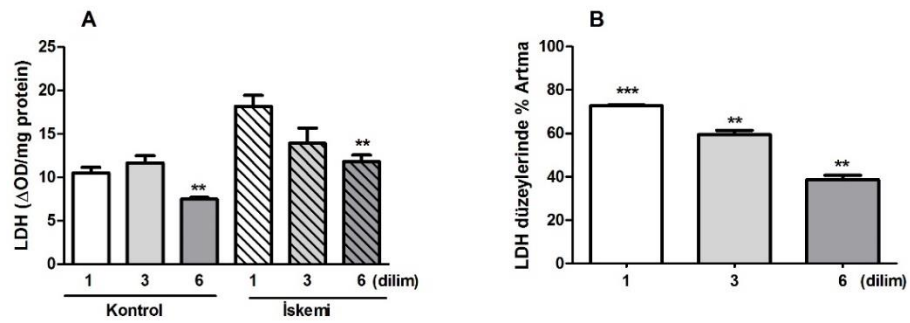
**Şekil 6.** İn vitro iskemi-REO uygulaması sonrası kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunlukları (Şekil 6A) ve ortamdaki dilim sayısının boyanma yoğunluğundaki azalma üzerine etkisi (Şekil 6B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 30 dakika boyunca da oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler ise her iki dönemde de oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübe edildiler. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı ve boyanma yoğunlukları Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü. (Şekil A için, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  kontrol veya iskemi gruplarındaki bir dilim değerlerinden anlamlı derece farklı; Şekil B de ise, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , iskemi-REO'nun neden olduğu %azalmalar anlamlı derecede farklı)

TTC boyanma yoğunluğundaki azalmanın aksine, kortikal dilimlerin 30 dakikalık iskemi-REO sonrası doku MDA düzeylerindeki değişikliklerin ortamdaki dilim sayısından çok daha fazla etkilendiği gözlemlendi. İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde iskemi-REO'ya alınan dilimlerde doku MDA düzeyi  $16,40 \pm 3,3$  oranında artarken ( $p < 0,05$ ), dilim sayısının üçe çıkartılması bu artışı  $2,54 \pm 0,6$ 'e düşürdü ( $p > 0,05$ ). Ortamdaki dilim sayısı altıya çıkartıldığında ise, 30 dakikalık iskemi-REO doku MDA düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadı. İskemi-REO sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri ve iskemi-REO sonrası oransal değişiklikleri Şekil 7A ve 7B'de gösterilmiştir.



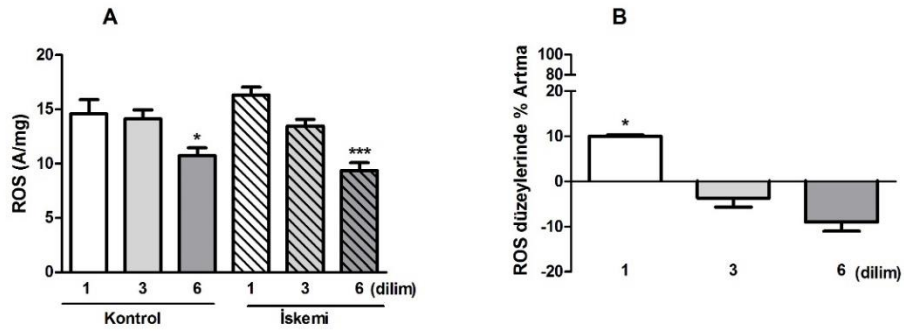
**Şekil 7.** İn vitro iskemi-REO uygulaması sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri (Şekil 7A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 7B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 30 dakika boyunca da oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler ise her iki dönemde de oksijen ve glukoz içeren ortamda inkübe edildiler. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası doku MDA düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A'da \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001, kontrol veya iskemi gruplarındaki bir dilim değerlerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise \*p<0,05, iskemi-REO'nun neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

REO döneminde ortama salınan LDH düzeylerindeki değişikliklerin de ortamdaki dilim sayısından çok fazla etkilendiği gözlemlendi. İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde iskemi-REO'ya alınan dilimlerde salınan LDH düzeyi  $72,81 \pm 3,3$  oranında artarken ( $p<0,001$ ), dilim sayısının üçe çıkartılması bu artışı  $59,43 \pm 2,4$  ( $p<0,01$ ), altıya çıkarılması ise  $38,67 \pm 2,1$ 'e düşürdü ( $p<0,01$ ). İskemi-REO sonrası kortikal dilimlerdeki LDH düzeyleri ve iskemi-REO sonrası oransal değişiklikleri Şekil 8A ve 8B'de gösterilmiştir.



**Şekil 8.** İn vitro iskemi-REO uygulaması sonrası kortikal dilimlerden reoksijenasyon döneminde salınan LDH düzeyleri (Şekil 8A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 8B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 30 dakika boyunca da oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler ise her iki dönemde de oksijen ve glukoz içeren ortamda inkübe edildiler. İkinci 30 dakikalık inkübasyon döneminde kortikal dilimlerden ortama salınan LDH düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*p<0,01, kontrol veya iskemi gruplarındaki bir dilim değerlerine göre anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, iskemi-REO'nun neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

Kortikal dilimlere uygulanan 30 dakikalık iskemi-reoksijenasyon sonrası doku ROS düzeylerindeki değişikliklerde ise, inkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde iskemi-REO'ya alınan dilimlerde doku ROS düzeyi  $10,01 \pm 0,4$  oranında artmış olarak bulundu ( $p<0,05$ ). Ortamdaki dilim sayısı üç veya altıya çıkartıldığında ise, 30 dakikalık iskemi-REO doku ROS düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadı. İskemi-REO sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri ve iskemi-REO sonrası oransal değişiklikleri Şekil 9A ve 9B'de gösterilmiştir.

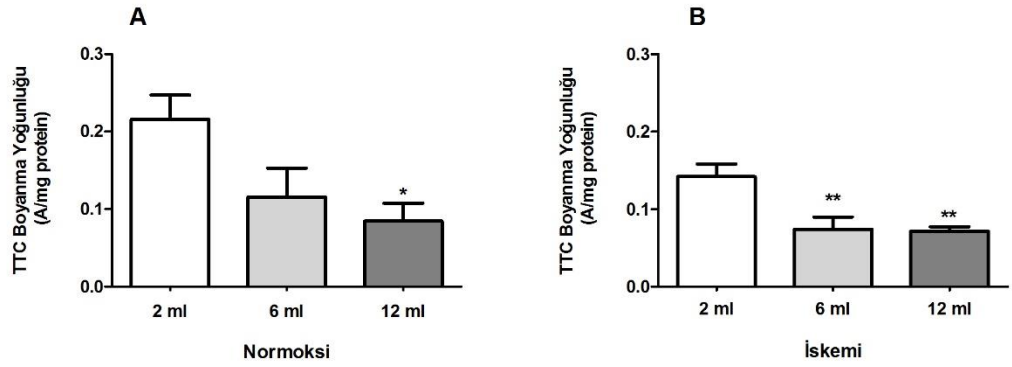


**Şekil 9.** İn vitro iskemi-REO uygulaması sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri (Şekil 9A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 9B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 30 dakika boyunca da oksijen ve glukoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimleri ise her iki dönemde de oksijen ve glukoz içeren ortamda inkübe edildiler. DCFH-DA, 30 dakikalık reoksijenasyon döneminde ortama eklendi (son konsantrasyonu 5  $\mu$ M). Doku ROS düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ , kontrol veya iskemi gruplarındaki bir dilim değerlerine göre anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \* $p<0,05$ \*, iskemi-REO'nun neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

### 4.3 Dilimlerin TTC ile boyanması üzerine inkübasyon hacmindeki artışın veya inkübasyon süresinin etkisi:

Materyal ve Metod kısmında belirtildiği inkübasyon hacmi ile ilgili çalışmalarda kortikal dilimler, her odacıkta 3'er dilim olacak şekilde, 2, 6 veya 12 ml Krebs içeren odacıklara yerleştirildi. Preinkübasyon dönemi ardından dilimler 30 dakika kontrol veya oksijen ve glikoz içermeyen ortamda, ardından da normoksik koşullarda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu dönemin sonunda bütün dilimler TTC boyaması için kullanıldı. Oksijen ve glikoz içeren normoksik (kontrol) bir ortamda 30 dakika boyunca inkübe edilen dilimlerin TTC ile boyanma yoğunluğu, inkübasyon ortam hacminin artışına bağlı olarak azalma gösterdi. İnkübasyon ortamı 2 ml iken elde edilen boyanma yoğunluğu  $0,216 \pm 0,03$  A/mg protein ölçülürken, hacim 6

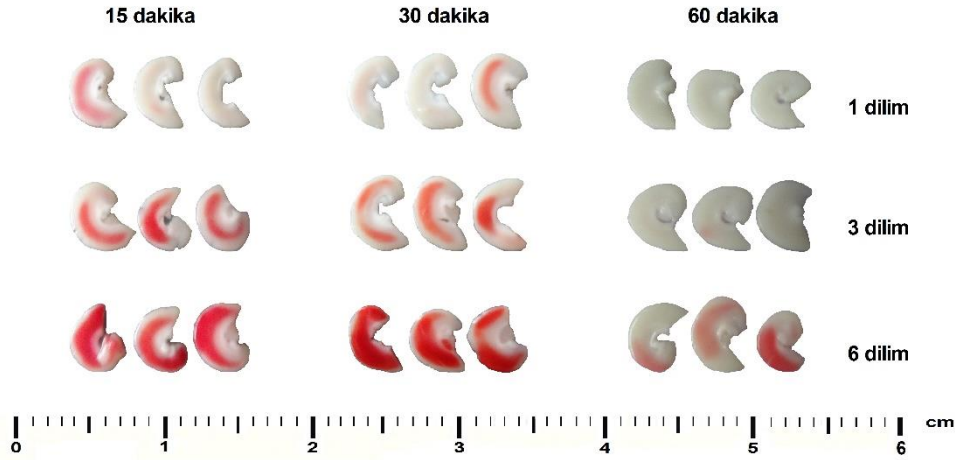
ml'ye çıkarıldığında  $0,116 \pm 0,04$  A/mg proteine ( $p>0,05$ ), 12 ml'de ise  $0,084 \pm 0,02$  A/mg proteine düştü ( $p<0,05$ ; Şekil 10A ). İki ml içinde inkübe edilen dilimlerde 30 dakikalık iskemi-REO sonrasında TTC boyanma yoğunluğu  $0,142 \pm 0,02$  A/mg protein ölçüldü. İnkübasyon ortam hacminin 6 ml'ye çıkartılması bu değeri  $0,075 \pm 0,02$ 'e düşürürken ( $p<0,05$ ), 12 ml'ye çıkartılması ise  $0,072 \pm 0,01$  A/mg proteine düşürdü ( $p<0,01$ ; Şekil 10B).



**Şekil 10.** İn vitro inkübasyon ortam hacminin normoksi (A) ve iskemi-REO (B) uygulaması sonrası kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunlukları üzerine etkisi. 2, 6 ve 12 ml inkübasyon ortamına 3'er dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 30 dakika boyunca da oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler ise her iki dönemde de oksijen ve glikoz içeren ortamda inkübe edildiler. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı ve boyanma yoğunlukları Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , normoksi veya iskemi gruplarındaki 2 ml değerinden anlamlı derecede farklı).

İnkübasyon süresi ile ilgili çalışmalarda ise, kortikal dilimler 2 ml Krebs içeren inkübasyon odacıklarına 1, 3 veya 6 dilim olacak şekilde yerleştirildi. Preinkübasyon dönemi ardından dilimler, 15, 30 veya 60 dakika boyunca kontrol veya oksijen ve glikoz içermeyen ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından dilimler 15, 30 veya 60 dakika daha normoksik koşullarda inkübe edildi. Bu dönem sonunda bütün dilimler TTC boyaması için kullanıldı. Şekil 11'de görüldüğü gibi, iskemi-REO süresinin uzaması dilimlerin TTC ile boyanabilirliklerinde belirgin bir azalmaya neden olurken, dilim sayısının arttırılması da boyanma üzerine olumlu etki gösterdi.

## İSKEMİ - REO



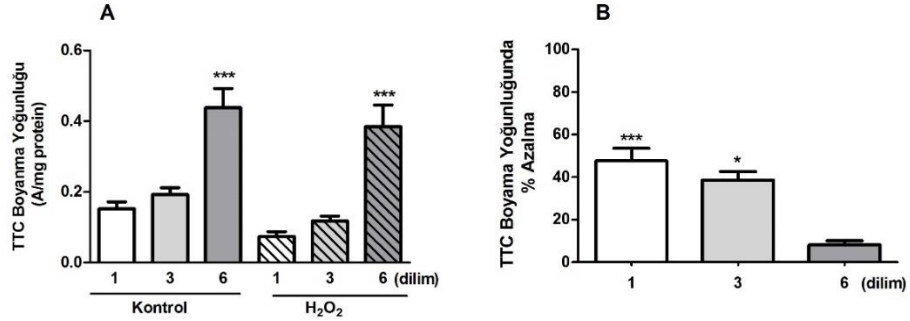
**Şekil 11.** İn vitro inkübasyon ortamındaki dilim sayısının, iskemi-REO süresi ile değişen TTC boyanma yoğunluğu üzerine etkisi. 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde inkübasyon ortamına yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 15, 30 ve 60 dakika boyunca iskemik ortamda ve bunu takip eden 15,30 ve 60 dakika boyunca da oksijen ve glukoz içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı. Boyama işlemi sonrası dilimler, fotoğraflarının çekilmesi amacıyla %5'lik formaldehid içine alındı.

### 4.4 Ortamdaki dilim sayısının farklı oksidatif stres modellerinin neden olduğu hasar büyüklüğüne etkisi:

#### 4.4.1 Ortamdaki dilim sayısının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif stres hasarı büyüklüğüne etkisi:

Beyin dilimleri inkübasyon sisteminde oksidatif stress hasarı oluşturmak için sıklıkla kullanılan metodlardan bir tanesi, dilimlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren bir ortamda inkübe edilmeleridir. Bu çalışmada dilimler, preinkübasyon dönemi ardından 60 dakika süre ile 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Krebs içinde inkübe edildi. İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TTC boyanma yoğunluğunda %51,54 ± 5,43 oranında azalmaya neden oldu (p<0,001). İnkübasyon ortamındaki dilim sayısı üçe çıkartıldığında bu değer %38,86 ± 4,31'e düşerken (p<0,05), dilim sayısının altıya çıkartılması kortikal dilimleri hemen tamamen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu TTC boyanma yoğunluğundaki azalmaya karşı korudu (azalma oranı %12,24 ± 1,82; p>0,05). İskemi-REO sonrası kortikal dilimlerdeki TTC boyanma yoğunlukları ve

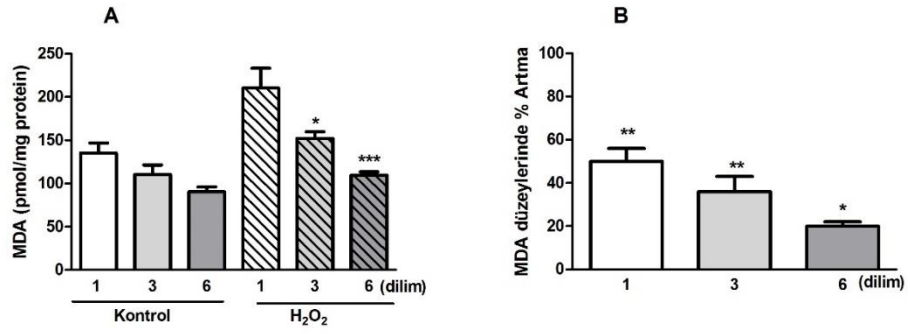
dilim sayısının boyanma yoğunluğu üzerine etkisi ile ilgili bulgular Şekil 12A ve Şekil 12B’de verilmiştir.



Şekil 12. 60 dakikalık 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunlukları (Şekil 12A) ve ortamdaki dilim sayısının boyanma yoğunluğundaki azalma üzerine etkisi (Şekil 12B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimleri ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmemiş Krebs içinde inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı ve boyanma yoğunlukları Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*\*p<0,001, kontrol veya iskemi gruplarındaki bir dilim değerlerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu % azalma anlamlı derecede farklı).

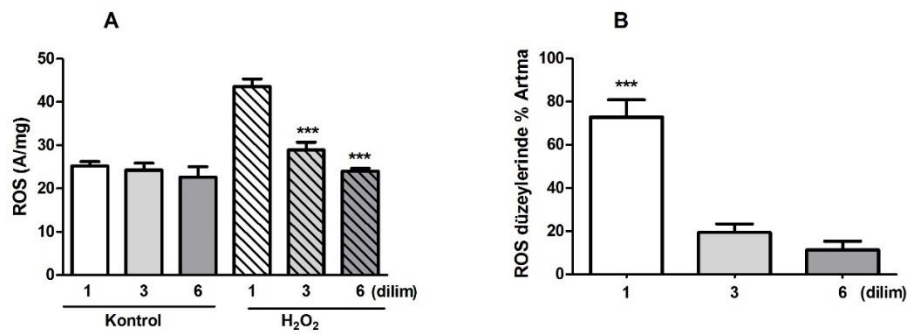
TTC boyanma yoğunluğundaki azalmaya benzer şekilde, kortikal dilimlerin 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 60 dakikalık inkübasyonu sonrası doku MDA düzeylerindeki değişikliklerin ortamdaki dilim sayısından çok fazla etkilendiği gözlemlendi. Ortamda tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doku MDA düzeyini %50,30 ± 6,29 oranında arttırırken (p<0,01), dilim sayısının üçe çıkartılması bu artışı %36,24 ± 7,08'e düşürdü (p<0,01). Dilim sayısının altıya çıkartılması koşullarında ise doku MDA düzeyi artışı %20,12 ± 2,22 düzeyinde kaldı (p<0,05). 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 60 dakikalık inkübasyon sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri ve oransal değişiklikleri Şekil 13A ve 13B’de gösterilmiştir.





**Şekil 13.** 60 dakikalık 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri (Şekil 13A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 13B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmemiş Krebs içinde inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası doku MDA düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001, kontrol veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarındaki bir dilim değerlerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*p<0,05; \*\*p<0,01, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

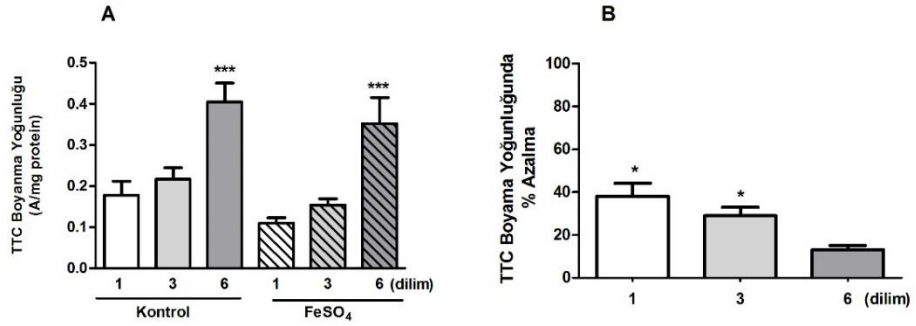
Kortikal dilimlerin 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 60 dakikalık inkübasyonu doku ROS düzeylerini de anlamlı bir şekilde arttırdı. Ortamda tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde doku ROS düzeyi %72,88 ± 8,15 (p<0,001) oranında artarken, ortamdaki dilim sayısı üçe ve altıya çıkartıldığında doku ROS düzeyindeki artışlar sırasıyla %19,43 ± 4,32 ve %11,37 ± 4,22 oranında bulundu (p>0,05). 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri ve ortamdaki dilim sayısına göre oransal değişiklikleri Şekil 14A ve 14B'de gösterilmiştir.



**Şekil 14.** 60 dakikalık 1 mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri (Şekil 14A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 14B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldılar. Kontrol dilimler ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmemiş Krebs içinde inkübe edildiler. DCFH-DA, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte inkübasyon döneminde ortama eklendi (son konsantrasyonu 5 µM). İnkübasyon sonrası doku ROS düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*\*p<0,001, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubundaki bir dilim değerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*\*\*p<0,001, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

#### 4.4.2 Ortamdaki dilim sayısının FeSO<sub>4</sub> + Askorbik asit ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi:

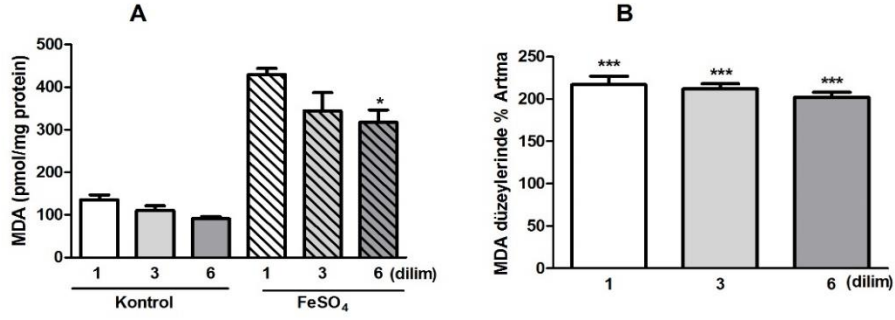
İn vitro koşullarda oksidatif hasar oluşturmak için sıkça kullanılan bir diğer model FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit modelidir. Bu amaçla beyin dilimleri 0.1 mM FeSO<sub>4</sub> + 20 µM askorbik asit içeren Krebs içinde 60 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit TTC boyanma yoğunluğunda %38,28 ± 6,12 oranında azalmaya neden oldu (p<0,05). İnkübasyon ortamındaki dilim sayısı üçe çıkartıldığında bu değer %29,03 ± 4,14'e düşerken (p<0,05), dilim sayısının altıya çıkartılması ise kortikal dilimleri hemen tamamem FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit inkübasyonunun neden olduğu TTC boyanma yoğunluğundaki azalmaya karşı korudu (azalma oranı % 13,10 ± 1,92; p>0,05). FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit inkübasyonu sonrası TTC boyanma yoğunlukları ve dilim sayısının boyanma yoğunluğu üzerine etkisi ile ilgili bulgular Şekil 15A ve Şekil 15B'de verilmiştir.



**Şekil 15.** 60 dakikalık 1 mm FeSO<sub>4</sub> + Askorbik asit inkübasyon sonrası kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunlukları (Şekil 15A) ve ortamdaki dilim sayısının boyanma yoğunluğundaki azalma üzerine etkisi (Şekil 15B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 0,1 mM FeSO<sub>4</sub> + 20 µM askorbik asit içeren veya içermeyen (kontrol) ortamda inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı ve boyanma yoğunlukları Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*\*p<0,001, kontrol veya FeSO<sub>4</sub> gruplarındaki bir dilim değerlerine göre anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*p<0,05, FeSO<sub>4</sub> 'ın neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

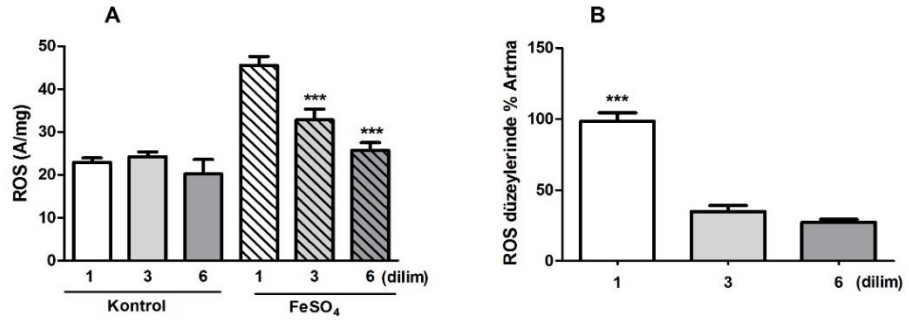
TTC boyanma yoğunluğundaki azalmanın aksine, kortikal dilimlerin 0.1 mM FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit ile 60 dakikalık inkübasyonu sonrası doku MDA düzeylerindeki değişikliklerin ortamdaki dilim sayısından çok fazla etkilenmediği gözlemlendi. İnkübasyon ortamında tek dilimin bulunduğu koşullarda doku MDA düzeyi %217,20 ± 10,49 oranında artarken (p<0,001), dilim sayısı üç olduğunda bu artış %212,14 ±

6,57 bulundu ( $p<0,001$ ), Dilim sayısının altıya çıkartılması ise, MDA düzeyindeki artışı çok fazla etkilemedi (artış oranı  $\%202,02 \pm 6,32$ ;  $p<0,001$ ).  $\text{FeSO}_4$  + askorbik asit inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri ve ortamdaki dilim sayısına göre MDA düzeyindeki oransal değişiklikler Şekil 16A ve 16B’de gösterilmiştir.



**Şekil 16.** 60 dakikalık  $\text{FeSO}_4$  + askorbik asit inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki MDA düzeyleri (Şekil 16A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 16B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 0.1 mM  $\text{FeSO}_4$  + askorbik asit içeren veya içermeyen (kontrol) ortamda inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrası doku MDA düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için,  $*p<0,05$ ,  $\text{FeSO}_4$  grubundaki bir dilim değerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise,  $***p<0,001$ ,  $\text{FeSO}_4$ 'ün neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

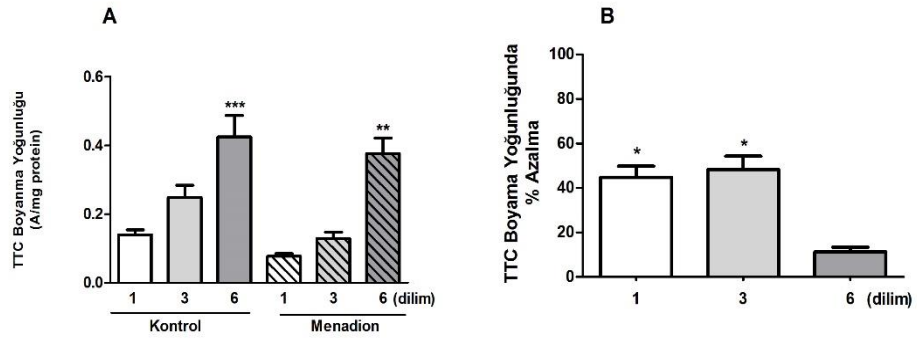
MDA düzeylerinin aksine,  $\text{FeSO}_4$  + askorbik asit inkübasyonu sonrası dokuda meydana gelen ROS artışı ortamdaki dilim sayısından fazlaca etkilendiği gözlemlendi. İnkübasyon ortamında tek dilim varken doku ROS düzeyi  $\%98,39 \pm 6,35$  ( $p<0,001$ ) oranında artarken, dilim sayısı üçe ve altıya çıkartıldığında bu artış sırasıyla  $\%35,09 \pm 3,83$  ve  $\%27,27 \pm 2,05$  düzeylerinde kaldı ( $p>0,05$ ).  $\text{FeSO}_4$  + askorbik asit ile 60 dakikalık inkübasyon sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri ve ortamdaki dilim sayısına göre oransal değişiklikleri Şekil 17A ve 17B’de gösterilmiştir.



**Şekil 17.** 60 dakikalık FeSO<sub>4</sub>+ askorbik asit ile inkübasyon sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri (Şekil 17A) ve ortamdaki dilim sayısına göre bu düzeylerdeki oransal değişiklikler (Şekil 17B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 60 dakika boyunca 0.1 mM FeSO<sub>4</sub>+ askorbik asit içeren veya içermeyen (kontrol) ortamda inkübasyona bırakıldılar. DCFH-DA, FeSO<sub>4</sub> modeli için 0,1 mM FeSO<sub>4</sub>+ askorbik asit (20 µM) ile birlikte ortama eklendi (son konsantrasyonu 5 µM). İnkübasyon sonrası doku ROS düzeyleri Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü. (Şekil A için, \*\*\*p<0,001, FeSO<sub>4</sub> grubundaki bir dilim değerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*\*\*p<0,001, FeSO<sub>4</sub>'ün neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

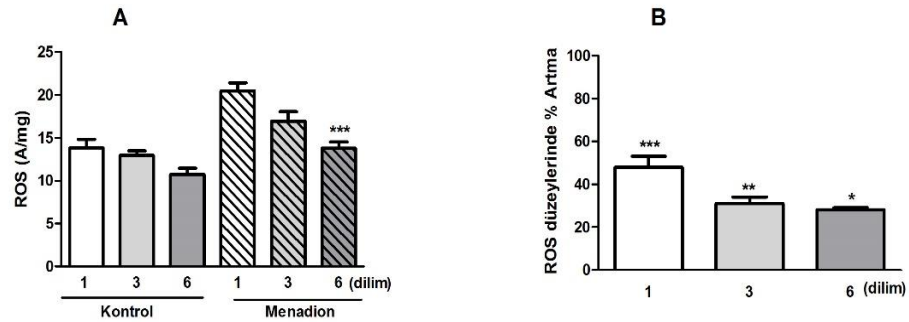
#### 4.4.3 Ortamdaki dilim sayısının Menadion ile indüklenen oksidatif stres hasarının büyüklüğüne etkisi:

Ortamdaki dilim sayısının oksidatif hasar düzeyini etkileyebilirliğini test etmek için kullandığımız bir diğer yöntem menadion yöntemidir. Burada dilimler 30 dakika süre ile 1 mM menadion içeren Krebs içinde inkübe edildiler. Daha sonra bütün dilimler menadionsuz ortama alınarak inkübasyonları 30 dakika daha sürdürüldü. İnkübasyon ortamında tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde menadion TTC boyanma yoğunluğunda  $44,78 \pm 5,93$  oranında azalmaya neden oldu ( $p<0,05$ ). Ortamındaki dilim sayısı üçe çıkartılması menadionun neden olduğu azalmayı etkilemezken ( $48,31 \pm 6,20$ ;  $p<0,05$ ), dilim sayısının altıya çıkartılması kortikal dilimleri menadion inkübasyonunun neden olduğu TTC boyanma yoğunluğundaki azalmaya karşı korudu (azalma oranı  $11,35 \pm 2,11$ ;  $p>0,05$ ). Kortikal dilimlerin menadion ile inkübasyonunu sonrası TTC boyanma yoğunlukları ve dilim sayısının boyanma yoğunluğu üzerine etkisi ile ilgili bulgular Şekil 18A ve Şekil 18B'de verilmiştir.



**Şekil 18.** Menadion inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunlukları (Şekil 18A) ve ortamdaki dilim sayısının boyanma yoğunluğundaki azalma üzerine etkisi (Şekil 18B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca 1 mM menadion içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından bütün dilimler menadionsuz normoksik ortama alınarak 30 dakika daha inkübe edildi. Kontrol dilimler ise her iki inkübasyon döneminde normoksik koşullarda inkübe edildi. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası dilimler TTC ile boyandı ve boyanma yoğunlukları Materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001; kontrol ve menadion grubundaki bir dilim değerlerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*p<0,05\*\*, menadionun neden olduğu % azalma anlamlı derecede farklı).

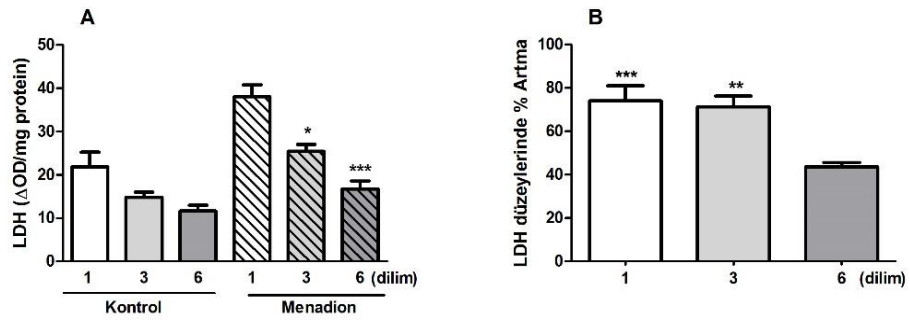
Menadion, inkübasyon ortamında bir dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimlerde ROS düzeyini  $48,01 \pm 5,31$  oranında arttırdı. Ortamdaki dilim sayısı üç veya altıya çıkartıldığında ise ROS düzeylerinde sırasıyla  $31,04 \pm 1,23$  ( $p<0,01$ ),  $28,12 \pm 3,04$  seviyelerinde kaldı ( $p<0,05$ ). Menadion inkübasyonu sonrası doku ROS düzeyleri ve ortamdaki dilim sayısının ROS artışı üzerine oransal etkisi Şekil 19A ve 19B’de gösterilmiştir.



**Şekil 19.** Menadion inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki ROS düzeyleri (Şekil 19A) ve ortamdaki dilim sayısının ROS artışı üzerine etkisi (Şekil 19B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca 1 mM menadion içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından bütün dilimler menadionsuz normoksik ortama alınarak 30 dakika daha inkübe edildi. Kontrol dilimler ise her iki inkübasyon döneminde normoksik koşullarda inkübe edildi. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası dilimlerdeki ROS düzeyi materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü (Şekil A için, \*\*\*p<0,001, menadion grubundaki bir dilim değerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001, menadionun neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

Menadion inkübasyonu, TTC boyanma yoğunluğu, doku MDA ve ROS düzeylerinde olduğu gibi kortikal dilimlerden LDH çıkışında da anlamlı artışlara neden oldu. Menadion, inkübasyon ortamına tek dilim olacak şekilde yerleştirilen

dilimlerde LDH çıkışını  $74,02 \pm 7,03$  oranında arttırırken ( $p < 0,001$ ), dilim sayısının üçe çıkartılması bu artışı anlamlı bir şekilde etkilemedi ( $71,27 \pm 5,54$ ;  $p < 0,01$ ). Ortamdaki dilim sayısının, altıya çıkarılması ise %menadionun neden olduğu bu artışı  $43,61 \pm 2,04$ 'e düşürdü ( $p > 0,05$ ). Menadion inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerdeki LDH düzeyleri ve sonrası oransal değişiklikleri Şekil 20A ve 20B'de gösterilmiştir.



**Şekil 20.** Menadion inkübasyonu sonrası kortikal dilimlerden salıverilen LDH miktarları (Şekil 20A) ve ortamdaki dilim sayısının LDH çıkışı üzerine etkisi (Şekil 20B). İnkübasyon ortamına 1, 3 ve 6 dilim olacak şekilde yerleştirilen kortikal dilimler preinkübasyon dönemi sonrası 30 dakika boyunca 1 mM menadion içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından bütün dilimler menadionsuz normoksik ortama alınarak 30 dakika daha inkübe edildi. Kontrol dilimleri ise her iki inkübasyon döneminde de normoksik koşullarda inkübe edildi. İkinci 30 dakikalık inkübasyon sonrası ortama salıverilen LDH miktarları materyal ve Metod kısmında belirtildiği şekilde ölçüldü. (Şekil A için, \* $p < 0,05$  ve \*\*\* $p < 0,001$ , kontrol veya menadion grubundaki bir dilim değerlerinden anlamlı derecede farklı; Şekil B de ise, \*\* $p < 0,01$  ve \*\*\* $p < 0,001$ , menadionun neden olduğu % artış anlamlı derecede farklı).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Beyin dilimleri, in vitro koşullarda çalışılan beyin bölgesindeki sinaptik aralıkları içermesi yanında, ekstraselüler çevreyi kapsayarak temel yapıyı koruduğu için nörodejeneratif ve nöro-gelişimsel alanda sıklıkla kullanılan deneysel modeller arasında önemli bir yer almaktadır. Hazırlanmasının kolay olması, deneysel işlemin saatler içinde bitirilebilmesi, elektrofizyolojik çalışmalara uygun olması gibi avantajları nedeni sıklıkla kullanılan bu yöntemin optimizasyonu, elde edilen sonuçların tutarlılığı ve/veya güvenilirliği açısından son derece önemlidir.

Konu ile ilgili çalışmalara bakıldığında, yöntemin optimize edilmesi ile ilgili yapılan çalışmaların 5 ana başlık altında toplandığı görülmektedir. Bunlar; 1) beyin dilimlerinin kalınlığı, 2) deney hayvanının dekapite edilmesi ve beyin dilimlerinin hazırlanarak oksijenlendirilmiş ve soğutulmuş fizyolojik sıvı içine alınması arasında geçen süre, 3) preinkübasyon koşulları ve süresi, 4) inkübasyon ortam sıcaklığı, 5) dilimlerin inkübe edildiği ortamın kompozisyonudur.

Yapılan çalışmalar hazırlanan beyin dilimlerinin her iki yüzeyinde, yaklaşık 50 µm derinliğe kadar olan doku bölgesi içinde dilimlemeye bağlı hasarlanmanın en fazla olduğunu göstermiştir (Lipton ve Whittingham, 1984). Dolayısı ile beyin dilimlerinin inceliğinin azaltılması, hasarlı doku oranının artmasına neden olurken, kalınlığının artması, fizyolojik sıvı içindeki çözülmüş maddelerin ve iyonların dokunun derin tabakalarına difüzyonunu zorlaştıran bir durumdur (Newman ve ark., 1988). Örneğin 540 mikrondan daha kalın dilimlerde yetersiz glukoz difüzyonundan dolayı, glikoz tüketiminin azaldığı, buna bağlı olarak laktat düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Newman ve ark., 1988). Benzer şekilde kalın dilimlerde, özellikle yüzeyden uzak iç kısımlarda iskemi benzeri bir tablo gözlenildiği ve 2 saatlik inkübasyon sonucu 50 µm derinliğe kadar olan doku bölgelerinin hasarlandığı çalışmalarla ortaya konmuştur (Lipton and Whittingham, 1984). Ancak, yeni geliştirilen yöntemlerle, dilimlerin yüzeyinden uzak bölgelerinde iskemi benzeri tablo oluşmadan 1 mm'ye kadar kalın dilimler kullanılabilir (Wu ve ark., 2005). Çok sayıda, çeşitli hücre katmanı ve sinaptik bağlantı içermesi nedeni ile bazı araştırmacılar tarafından kalın beyin dilimlerinin kullanılması özellikle tercih edilmektedir. Örneğin hipokampal beyin

dilimlerinin kullanıldığı araştırmalarda, 500 mikrondan ince ve kalın beyin dilimleri ile yapılan elektrofizyolojik çalışmaların farklı sonuçlar doğurduğu gözlenmiştir (Ishizuka ve ark., 1990; Li ve ark., 1994). Bu sonucun, ince dilimlerin hipokampustaki CA1 ve C3 bölgelerini birlikte içermemesi ve bu iki bölge arasındaki iletişim eksikliğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2002). İnce ve kalın hazırlanmış dilimlerin yukarıda belirtilen sakıncalarını en aza indirmek adına, 300-500 m kalınlığındaki dilimlerin kullanılması genellikle tercih edilmektedir.

Beyin dilimlerinin kalınlığı yanında, deney hayvanının dekapite edilmesi ve beyin dilimlerinin hazırlanarak oksijenlendirilmiş ve soğutulmuş fizyolojik sıvı içine alınması arasında geçen sürenin de optimize edilmesi sonuçların tutarlılığı açısından önemlidir. Birçok araştırmacı bu sürenin mümkün olduğu kadar kısa olması gerektiğini vurgulamışsa da, hipokampusun CA1 bölgesinden elde edilen eksitator sinaptik potansiyelin, dekapitasyondan 30 dakika sonra hazırlanan dilimlerden bile hemen hemen tamamen elde edilebildiğı rapor edilmiştir (Shurr ve ark., 1984). Bu sürenin kısalığının dokuda meydana gelecek iskemik hasarın en aza indirilmesi açısından önemli olduğu genel kabul gören bir görüş olduğu için, bunu en aza indirmek amacı ile değişik uygulamalar da geliştirilmiştir; dekapitasyon öncesi hayvanın anestezi edilmesi, anestezi altındaki hayvanın soğuk fizyoloji sıvı ile trans-kardiyal perfüzyonu (Edwards ve ark., 1989; Mayor ve Brown, 2002), dekapitasyon sonrası çıkartılan beynin içine alındığı veya beyin dilimlerinin hazırlandığı fizyolojik ortamın kompozisyonunun değiştirilmesi ( $Ca^{+2}$ 'un azaltılarak  $Mg^{+2}$ 'un artırılması, NaCl yerine sukroz kullanılması, glutamat eksitotoksitesini azaltmak adına antagonistlerinin kullanılması gibi) (Aitken ve ark., 1995; Kass ve ark., 1992) başvurulan stratejiler arasında sayılabilir.

İzole doku veya organların kullanıldığı hemen bütün in vitro çalışmalarda, vücut dışına çıkartılıp organ banyosuna yerleştirilen dokunun, bu koşullara adapte olması için belirli bir süre preinkübasyon periyoduna alınması, mutlaka uygulanması gereken bir işlemdir. Benzer durum beyin dilimleri için de geçerlidir. Beyin dilimlerinin kullanıldığı deneylerde de, dekapitasyon sonrası beynin çıkartılması, çalışılacak beyin bölgesinin diseksiyonu ve ardından dilimlenmesi maksimum hız ve uygun koşullarda yapılırsa bile, bu işlemlerin dokuda bir hasarlanmaya ve ATP dahil



bir çok endojen maddenin doku seviyelerinde azalmaya neden olması kaçınılmazdır. Dokuda meydana gelmiş geri dönüşümlü hasarın en aza indirilmesi ve boşalmış endojen depoların yeniden dolmasının sağlanması için dilimlerin deneysel prosedüre başlamadan önce mutlaka preinkübasyon dönemine alınması gereklidir. Bu dönemin süresi için de bir görüş birliği olmamakla birlikte genellikle 30–60 dakikalık bir preinkübasyon periyodu uygulanmaktadır.

Preinkübasyon döneminin süresi ile ilgili yapılan bir çalışmada, ATP gibi düzeyi azalan metabolik parametrelerin dilimler hazırlandıktan 2-4 saat sonra en üst düzeyine ulaştığı gösterilmiştir (Alger ve ark., 1984). Benzer şekilde, hazırlanan beyin dilimlerindeki hemen bütün metabolik parametrelerin en kararlı duruma 1 saatlik preinkübasyon periyodu sonunda ulaştığı belirtilmiştir (Alger ve ark., 1984). Konu ile ilgili olarak bölümümüzde yapılan bir çalışmada, beyin dilimlerinden ortama salıverilen laktat dehidrogenaz enzim seviyesinin preinkübasyon dönemi boyunca azalma gösterdiği ve yaklaşık 90 dakikada minimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir (Buyukuysal, 2015). Yine bölümümüzde yapılan diğer bir çalışmada da, dokunun diseksiyonu, dilimlenmesi ve dilimlerin birbirlerinden ayrılması aşamalarında azalan doku dopamin miktarlarının preinkübasyon dönemi boyunca arttığı ve yaklaşık 60-90 dakikada en üst düzeyine ulaştığı bulunmuştur (Buyukuysal ve Moğol, 2000).

Araştırmacıların dilimlerin canlılığını arttırmak veya canlı kalma süresini uzatmak adına farklı preinkübasyon protokolleri uyguladıklarına da sıkça rastlanabilir. Bu farklılıklardan bir tanesi, dilimlerin inkübe edildiği fizyolojik çözeltinin kompozisyonunun değiştirilmesidir. Beyin dilimleri hazırlanması ve inkübasyonu sırasında, en önemli hasar mekanizmalarından birinin glutamat ekzositozu olduğuna inanılmaktadır (Moyer ve Brown, 2002). Dilimleri bu hasara karşı korumak için bazı araştırmacılar preinkübasyon döneminde kullanılan çözelti içine kaynurenik asit (Clark ve Rothman, 1987) veya ketamin (Aitken ve ark., 1995) gibi iyonik glutamat reseptör blokörleri veya sinaptik transmisyonu tamamen engelleyen genel blokörler kullanmışlardır. Diğer taraftan glutamatın neden olduğu bu hasarlanma hücre içine aşırı miktarda  $Ca^{+2}$  girişi ile yakından ilgili olduğu için (Choi, 1994; Lehmann ve Jacobson, 1990) inkübasyon çözeltisinden başlangıçta bu iyonun çıkartılması veya

miktarının azaltılması da kullanılan yöntemler arasındadır (Feig ve Lipton, 1990). Preinkübasyon döneminin en az 1/3'lük kısmının oda ısısında yürütülmesi de farklı uygulamalardan bir diğeridir (Leybaert , 1996; Lipton ve ark., 1995).

Beyin dilimlerinin inkübasyon veya perfüzyonu için genellikle fizyolojik Krebs çözeltisi veya benzeri çözeltiler sıklıkla kullanılsa da, dilimleri inkübasyon koşullarının verebileceği hasara karşı korumak adına, içeriği değiştirilmiş farklı fizyolojik çözeltilerin kullanıldığı çalışmalara rastlamak da mümkündür. Dilimleri inkübasyon ortamındaki fazla oksijen ve türevlerinin neden olabileceği oksidatif hasara karşı korumak için fizyolojik çözelti içine askorbat eklenmesi (Rice, 1999), metabolizmayı desteklemek için pirüvat (Matthews ve ark., 2003) veya laktat içeren çözelti kullanılması (Schurr ve ark., 1997), dokuların su almasını azaltmak ve lizisini engellemek adına sodyum klorür yerine kolin klorür (Magee ve ark., 1996) kullanılması sıkça başvurulan uygulamalar arasında sayılabilir.

Beyin dilimlerinin kullanıldığı in vitro çalışmalar arasında görüş birliğinin en az olduğu konuların başında inkübasyon/perfüzyon ortamının sıcaklığı gelmektedir. Genellikle normal fizyolojik sıcaklık (36–37 °C) tercih edilse de, bunun çok daha altında, hatta oda sıcaklığında (21–23 °C gibi) yapılmış çalışmalara da sıkça rastlamak mümkündür (Espanol ve ark., 1994; Larkman ve ark., 1988; Leybaert ve Hemptinne, 1996).

Düşük sıcaklıkta metabolizmanın yavaşladığı, dilimlerin canlılıklarını daha uzun süre devam ettirdikleri bilinmektedir. Gerçekten de, yapılan çalışmalarda inkübasyon ortamındaki 1 derecelik sıcaklık değişikliğinin bile, özellikle iskemi ve benzeri koşullarda ölçülen parametrelerde çok büyük değişikliklere neden olabildiği gösterilmiştir. Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada, ortam sıcaklığının 37°C'den 36 °C'ye düşürülmesinin striatal dilimleri anoksinin neden olduğu dopamin salıverilmesine karşı önemli ölçüde koruduğu gösterilmiştir. (Buyukuysal and Mete, 1999). Benzer şekilde, inkübasyon ortam sıcaklığındaki birer derecelik farkın bile doku canlılığını değiştirdiği ve bunun iyonik glutamaterjik reseptörlerle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Anatoly ve ark., 2014). Bu nedenle, inkübasyon veya perfüzyon odacıklarının yerleştirildiği su banyosunun sıcaklığı istenen dereceye ayarlanmış olsa

bile, odacıkların içindeki fizyolojik ortamın sıcaklığının kontrol edilmesi, sonuçların tutarlılığı açısından son derece önemlidir.

Beyin dilimlerinin kullanıldığı çalışmalarda sonuçların tutarlılığı açısından optimize edilmesi gereken bir diğer önemli nokta, perfüzyon ve inkübasyon tekniklerinden hangisinin tercih edileceğidir. Perfüzyon tekniği, dilimlerin içine yerleştirileceği perfüzyon odacıkları (0,5–1 cm<sup>3</sup>) içinden, ısıtılmış ve %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan fizyolojik sıvının peristaltik pompa yardımı ile geçirilmesi esasına dayanır. Perfüzyon hızı, odacıkların hacmine, içine yerleştirilen dilimlerin miktarına göre değişebilir (0,3–1 ml/dakika gibi). Kullanılacak pompanın, pulsasyon yapmayan ve sabit hızda sıvı akışına olanak veren özellikte olması önemlidir (Hajos ve ark., 2009). Söz konusu pompaların 2, 4 veya 8 kanallı olması, aynı anda kanal sayısı kadar odacık perfüze edilebilmesine olanak verir. Deneye başlamadan önce bütün kanalların akış hızlarının eşit olup olmadığının kontrol edilmesi, sonuçların tutarlılığı açısından önemlidir. Perfüzyon tekniğinin en önemli üstünlüğü, dilimlerin devamlı fizyolojik sıvı ile yıkanması ve ortama salıverilen yararlı veya zararlı bütün endojen maddelerin sürekli bir şekilde uzaklaştırılmasıdır. Tekniğin en önemli sakıncalarından biri ise, perfüzyon odacıkları içinde biriken hava kabarcıklarının dilimlerin fizyolojik sıvı ile temasını engellemesi ve bu durumun dilimleri anoksi benzeri bir ortama sokabilmesidir (Hajos ve Mody, 2009). Bu nedenle perfüzyon odacıkları içinde hava kabarcıkları birikmesinin önlenmesi sonuçların tutarlılığı açısından son derece önemlidir.

İnkübasyon tekniği ise, gazlandırılmış fizyolojik çözelti içeren inkübasyon tüp veya odacıklarına dilimlerin yerleştirilmesi ve dilimlerin bunların içinde inkübasyona bırakılması esasına dayanır. Yöntemin en önemli sakıncası, dilimlerden salıverilen endojen maddelerin ortamda birikmeleridir. Ancak bu sorun, inkübasyon ortamının belirli aralıklarla değiştirilmesi ile giderilebilir. Bu esnada dilimleri uyaracak veya onlara zarar verecek mekanik travma oluşturmamaya dikkat edilmelidir.

Perfüzyon olsun, inkübasyon olsun, kullanılan her iki yöntemde de, ortamdaki dilim sayısının gözlenen sonuçların tutarlılığına etkisi bilinmemektedir. Yukarıda ifade edildiği gibi, perfüzyon tekniğinin üstünlüğü dilimlerden salıverilen endojen maddelerin süratle ortamdan uzaklaştırılmaları iken, inkübasyon tekniğinin sakıncası

bu endojen maddelerin ortamda zaman içinde birikmeleridir. Dilimlerden birçok nörotansmitter, büyüme faktörü, protein, aminoasitler ve diğer endojen maddelerin salıverildiği düşünüldüğünde, bunların neden olabileceği olumlu veya olumsuz etkiler açısından perfüzyon tekniğinde perfüzyon hızı ve ortamdaki dilim sayısı, inkübasyon tekniğinde ise inkübasyon hacmi yanında ortamdaki dilim sayısının sonuçlar üzerine etkisinin bilinmesi, kullanılacak yöntemin optimize edilmesi açısından önemlidir.

Bu tez kapsamında sunulan ilk bulgu, eşit hacimde (2 ml) oksijenlendirilmiş fizyolojik çözelti içeren bir ortamda inkübasyona bırakılan kortikal dilimlerin TTC ile boyanabilirlikleri üzerine ortamdaki dilim sayısının etkisi ile ilgilidir. Şekil 4’de görüldüğü gibi, normoksik koşullarda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılan dilimlerin boyanma yoğunluğu, ortamdaki dilim sayısı arttıkça anlamlı bir şekilde artmaktadır. Dokuların TTC ile boyanma yoğunluğunun, onların canlılığını gösteren bir parametre olduğu düşünülürse (Altman, 1974; Bederson ve ark., 1986; Bednar ve ark., 1994; Belayev ve ark., 1999; Cole ve ark., 1990), inkübasyon ortamına yerleştirilen dilim sayısının artırılmasının dokuların canlılığı üzerine olumlu bir etki gösterdiği söylenebilir. Gözlenen bu etkinin mekanizması bu tez kapsamında incelenmemiş olmakla birlikte, olası mekanizmaları etraflı bir şekilde tartışılacaktır.

Beyin dilimleri ile ilgili 1995’te yapılan ve araştırmacıların beyanlarının Neuroscience Methods dergisinde yayınlandığı toplantıda benzer bir durumdan Tim Teyler ‘ın bahsettiğini görmekteyiz (Aitken ve ark., 1995). Teyler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda; inkübe edilen dilimlerin, perfüzyona oranla daha iyi doku fizyolojisine sahip olduklarını gözlemlenmiştir. Bu durumun inkübe edilen dilimlerden inkübasyon ortamına salınan ve ortamda biriken endojen maddelerin etki veya etkilerine bağlı olabileceği yorumunu yapmışlardır. Bunun üzerine yaptıkları bir diğer çalışmada, inkübasyon ortam çözeltisi olarak on sıçan beyninden sukroz ile ekstrakte ettikleri ekstraselüler ortamı kullanmışlar ve bu çözelti ile inkübe edilen dilimlerin daha önce gözlemlenemeyen mükemmel fizyolojiye sahip olduklarını ifade etmişlerdir (Aitken ve ark., 1995).

Teyler ve arkadaşlarının yukarıda ifade edilen ve belki de bu konuda tek olan bu gözlemleri, normoksik koşullarda inkübe edilen dilimlerin TTC ile boyanma yoğunluğunun ortamdaki dilim sayısına bağlı olarak artmasının olası nedenini ifade

eder niteliktedir. Dolayısı ile Şekil 4’de gözlenen etkinin, dilimlerden salıverilen ve ortamda konsantrasyonu giderek artan bu endojen maddelerden bazılarına bağlı olması olasıdır. Bu tez kapsamında, TTC boyanması açısından söz konusu olasılık, tek bir dilimin artan miktarlarda fizyolojik çözelti içeren koşullarda inkübe edilmesi ile de test edilmiştir. Böylece, inkübasyon hacmi arttırılarak, tek bir dilimden 1 saat boyunca ortama salıverilen endojen maddelerin konsantrasyonlarının azaltılması amaçlanmıştır. Tek bir dilimin inkübe edildiği hacmin 2 ml’den 12 ml’ye çıkartılması, TTC boyanma yoğunluğunda yaklaşık %61,1 azalmaya neden olmuştur. Bu bulgu da yukarıda ifade edilen olasılığı destekler niteliktedir.

TTC boyanmasına ek olarak, normoksik koşullarda inkübe edilen dilimlerden inkübasyon ortamına salıverilen ve doku hasarının bir göstergesi olan LDH enzim miktarı ile yine doku hasar çalışmalarında sıklıkla kullanılan doku MDA miktarının da, ortamdaki dilim sayısından etkilendiği gözlemlendi. Özellikle ortamdaki dilim sayısının altıya çıkartıldığı koşullarda, LDH çıkışı ve doku MDA düzeyleri, tek olacak şekilde inkübe edilen dilimlerden anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0.01$ ). MDA’nın özellikle serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyon ürünü olduğu bilinmektedir (GuttarLidge, 1995; Suttnar ve ark., 1997). Dolayısı ile normoksik koşullarda inkübe edilen kortikal dilimlerde, ortamdaki dilim sayısına göre TTC boyanma yoğunluğunda, LDH çıkışında ve doku MDA düzeylerinde gözlenen farklılıkların, ortamdaki dilim sayısına göre düzeyi değişen ROS ile ilişkili olma olasılığını düşündürdü. Söz konusu bu olasılık da, dilimlerde ROS düzeyinin ölçülmesi ile test edildi. Gerçekten de, inkübasyon ortamında tek bir dilim varken doku ROS düzeyi  $15,71 \pm 1,28$  FI/mg protein bulunurken, bu değer ortamda 3 veya 6 dilim varken sırası ile  $13,84 \pm 0,85$  ve  $10,79 \pm 0,69$  FI/mg protein düzeylerinde bulundu (sırası ile  $p>0,05$  ve  $p<0,01$ ; Şekil 5C).

Normoksik koşullarda gözlenen bütün bu bulgular, inkübasyon ortamındaki dilim sayısının arttırılmasının, hasarlanmadan önemli ölçüde sorumlu tutulan ROS düzeyinin azalmasına neden olduğu ve bunun da dilimlerin canlılığı üzerine olumlu etki gösterdiğini ifade etmektedir. Eğer bu olasılık doğru ise, inkübasyon ortamında ROS düzeyinin artmasına neden olarak doku hasarı oluşturan deneysel modellerden elde edilen sonuçların da ortamdaki dilim sayısından özellikle etkilenmesi gerekir.

Diğer bir ifade ile ortamdaki dilim sayısının arttırılmasının, dokuları ROS oluşumuna neden olan koşullardan koruması beklenir. Söz konusu olasılık, bu tez kapsamında ROS oluşumuna neden olarak doku hasarına yol açan dört farklı deneysel model kullanılarak test edildi; bunlar sırası ile iskemi-REO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit ve menadion modelleridir.

Ortamda tek dilim olacak şekilde inkübe edilen kortikal dilimlerin 30 dakika iskemi ve ardından 30 dakika normoksik koşullarda (REO) bırakılmaları TTC boyanma yoğunluğunda  $47,58 \pm 6,03$  oranında azalmaya neden olurken, diğer 3 deneysel modelde de benzer oranlarda azalma gözlemlendi. İnkübasyon ortamındaki dilim sayısının üçe çıkartılması boyanmadaki azalmayı kısmen geriye çevirirken (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deneysel modeli için  $p > 0,05$ ), özellikle altıya çıkartılması durumunda dört modelde de gözlenen azalma hemen tamamen ortadan kalktı ( $p < 0,001$ ).

Kortikal dilimlerin TTC ile boyanma yoğunluklarında gözlenen azalmada olduğu gibi, kullanılan 4 deneysel model de dokuda ROS ve lipid peoksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinde artmaya neden oldu. Ancak TTC boyanmasındaki azalmanın aksine, ROS ve MDA düzeylerindeki artış oranları ve ortamdaki dilim sayısının bu artış üzerine etkileri kullanılan deneysel modeller arasında belirgin farklılıklar gösterdi. Tek dilim olacak şekilde inkübe edilen dilimlerde iskemi-REO doku ROS düzeyini  $10 \pm 0,4$ , MDA düzeyini ise  $16,4 \pm 3$  arttırırken, bu artış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve menadion modellerinde çok daha yüksek oranlarda bulundu (sırası ile  $50,3 \pm 6,3$  ve  $48 \pm 5,3$ ). Ortamdaki dilim sayısının üçe veya altıya çıkartılması durumunda iskemi-REO ne doku ROS ve ne de MDA düzeylerini anlamlı bir şekilde etkilemedi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve menadion modellerinde ise ortamdaki dilim sayısının arttırılması bu parametrelerde belirgin azalmalara neden oldu. Bu üç modelin aksine FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit modeli, ortamdaki dilim sayısından etkilenmeyen bir şekilde doku MDA düzeylerine çok daha belirgin bir artışa neden; ortamda tek dilim varken doku MDA düzeyinin  $217 \pm 10$ , altı dilimin bulunduğu koşullarda ise  $202 \pm 6$  oranında arttığı gözlemlendi. Buna karşın bu model, doku ROS düzeyinde en fazla artışa neden olurken (ortamda tek dilim olduğu koşullarda  $98,4 \pm 6$ ), gözlenen bu artışın, doku MDA düzeylerindeki artışın aksine, ortamdaki dilim sayısından anlamlı bir şekilde etkilendiği gözlemlendi.

Dokuda meydana gelen hasarlanmanın büyüklüğünü göstermek adına sıkça kullanılan bir diğer parametre, hasarlanmış hücrelerden inkübasyon ortamına salıverilen LDH miktarının ölçülmesidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub> + askorbik asit modellerinde, inkübasyon ortamına salıverilen LDH miktarları, söz konusu yöntemlerde kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve FeSO<sub>4</sub>'ın spektrofotometrik olarak yapılan LDH ölçümünü olumsuz etkilemesi nedeni ile değerlendirilemedi. Buna karşın, ortamda tek dilimin bulunduğu inkübasyon koşullarında iskemi-REO ve menadion modelleri LDH çıkışlarında benzer oranlarda artışa neden olurken (sırası ile %72,8 ± 3 ve %74 ± 7), bu artışların, özellikle ortamda altı dilimim bulunduğu koşullarda anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

Dokuda hasarlanmaya neden olan dört farklı modelin kullanılması sonucu elde edilen hemen bütün bulgular, normoksik koşullarda gözlemlendiği gibi, inkübasyon ortamındaki dilim sayısının artırılmasının dokuları oksidatif stres hasarına karşı koruduğunu göstermektedir. Bunun nedeni bu tez kapsamında çalışılmamış olmakla birlikte, dilim sayısının artışına bağlı olarak inkübasyon ortamında konsantrasyonu artan birçok endojen molekülün bunda rolünün olması olasıdır. Örneğin kortikal dilimlerde bol miktarda bulunan ve inkübasyon ortamına kolayca salıverilen ve inkübasyon süresince konsantrasyonu giderek artan laktat, alfa-ketoglutarat gibi alfa-keto asitlerin, glutamat, taurin gibi amino asitlerin oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir (Demircan ve ark., 2013; Grzesiak ve ark., 2016; Satpute ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2016 ). Bunlar akla gelen ilk olasılıklardır. Bunlar gibi birçok endojen molekülün zaman içinde inkübasyon ortamındaki konsantrasyonunun artmasının gözlenen etkilerdeki rollerinin olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak beyin dilimleri sinir bilim alanında sıklıkla kullanılan deneysel modeller arasında önemli bir yer almaktadır. Hazırlanmasının kolay olması, deneysel işlemin saatler içinde bitirilebilmesi, elektrofizyolojik çalışmalara uygun olması gibi avantajları nedeni sıklıkla kullanılan bu yöntemin optimizasyonu elde edilen sonuçların tutarlılığı ve/veya güvenilirliği açısından son derece önemlidir. Yöntemin optimize edilmesi açısından önemli olan ortam sıcaklığı, dilimlerin kalınlığı, preinkübasyon koşulları gibi noktalar dışında, bu tez kapsamında ortaya konan bir diğer önemli nokta ortamdaki dilim sayısının çalışma sonuçlarını etkileyebileceğidir.

Bu nedenle, beyin dilimleri inkübasyon yöntemi kullanılacaksa inkübasyon hacmi ve ortamdaki dilim sayısının standardize edilmesi, beyin dilimleri perfüzyon yöntemi kullanılacak ise, perfüzyon odacıklarına yerleştirilen dilim sayısı yanında perfüzyon hızının standardize edilmesinin çalışma sonuçlarının tutarlılığı ve tekrar edilebilirliği açısından önemli olduğu kanısındayız.





## 6. KAYNAKLAR

- Abe K, Saito H (1996) Menadione toxicity in cultured rat cortical astrocytes. *Japanese Journal of Pharmacology* 72: 299-306.
- Aitken PG, Breese GR, Dudek FF (1995) Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Methods* 59:139–149.
- Alger B, Dhanjal S, Dingledine R (1984) Brain slice methods. In: Dingledine R (ed) *Brain slices*, 1st edn. Plenum Press, New York.
- Altman FP (1974) Studies on the reduction of tetrazolium salts III. The products of chemical and enzyme reduction *Histochemistry* 38:155–171.
- Anatoly A, Mokrushin Larisa I, Pavlinova Sergey E et al (2014) Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. *Journal of Thermal Biology* 44:5–13.
- Bahr BA (1995) Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes *J Neurosci Res* 42:294-305.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM et al (1986) Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304–1308.
- Bednar MM, Fanburg JC, Anderson ML et al (1994) Comparison of triphenyltetrazolium dye with light microscopic evaluation in a rabbit model of acute cerebral ischaemia. *Neurol Res* 16:129–132.
- Belayev L, Busto R, Zhao W et al (1999) Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-l-lysine: neurological and histological validation *Brain Res* 833:181–190.
- Blokhina O, Virdainen E, Fagerstedt KU (2003) Antioxidants, Oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot* 91; 179-94.
- Bose B, Jones SC, Lorig R et al (1988) Evolving focal cerebral ischemia in cats: spatial correlation of nuclear magnetic resonance imaging, cerebral blood flow, tetrazolium staining and histopathology. *Stroke* 19:28 – 37.
- Buchel L, McIlwain H (1950) Narcotics and the inorganic and creatine phosphates of mammalian brain *Br J Pharmacol Chemother* 5:465–473
- Buchs PA, Stoppini L, Muller D (1993) Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 71:81-91.
- Burcak G, Andican G (2004) Oksidatif DNA hasarı ve yaslanma. *Cerrahpasa Tıp Dergisi* 4:35-44.

- Buskila Y, Amitai Y (2010) Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex *J Neurophysiol* 103:1322–1328.
- Buyukuysal RL, Moğol E (2000) Anoxia-Induced Dopamine Release from Rat Striatal Slices: Involvement of Reverse Transport Mechanism. *Journal of Neurochem Res* 25: 4: 533-40.
- Buyukuysal RL (2015) Nörodejeneratif Hasarda İn Vitro Beyin Dilimleri Modeli: 25 yıllık deneysel tecrübeden birkaç önemli not. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, s 41-44
- Chirico S (1994) High performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests, *Methods Enzymol* 233: 314-331.
- Cole DJ, Durummond JC, Ghazal EA et al (1990) A reversible component of cerebral injury as identified by the histochemical stain 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) *Acta Neuropathol (Berl)* 80:152–15.
- Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD et al (1986) Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 314:1670–1676.
- Cho S, Liu D, Fairman D et al (2004) Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int* 45:117-127.
- Choi DW (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann NY Acad Sci* 747:162–171.
- Clark GD, Rothman SM (1987) Blockade of excitatory amino acid receptors protects anoxic hippocampal slices. *Neuroscience* 21:665–671.
- Colbert CM (2006) Preparation of cortical brain slices for electrophysiological recording. *Methods Mol Biol* 337:117–25.
- Corse AM, Bilak MM, Bilak SR et al (1999) Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration *Neurobiol Dis* 6:335-346.
- Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK et al (2006) Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry* 281: 40485-40492.
- Dambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly S (2001) The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: Implications for neuroprotection *Molecular Medicine* 7:367-382.
- De Groot H, Rauen U (2007) Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation Proceedings* 39:481-484
- De Simoni A, Yu LMY (2006) Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method *Nat Protoc* 1:1439–1445.

Dekkers JC, Doornen van LCP, Kemper Han CG (1996) The Role of the Antioxidant Vitamins and Enzymes in the Prevention of Exercise- Induced Muscle Damage. *Sports Med* 21:213-238.

Del Rio JA, Heimrich B, Soriano E et al (1991) Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus *Neuroscience* 43:335-347.

Delange RJ, Glazer AN (1989) Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Peroxy-Radicals - a Screen for Biologically Relevant Protective Agents. *Anal Biochem* 177:300-306.

Demircan C, Gul Z, Buyukuysal RL (2014) High Glutamate Attenuates S100B and LDH Outputs from Rat Cortical Slices Enhanced by Either Oxygen-Glucose Deprivation or Menadione. *Neurochem. Res.* 39(7):1232-44.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability *J Immunol Methods* 89:271–277.

Desagher S, Glowinski J, Premont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *Journal of Neuroscience* 17: 9060-9067.

Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system *Pflugers Arch* 414:600–612

Elliot K, Wolfe L (1962) Brain tissue respiration and glycolysis. In: Thomas C (ed) *Neurochemistry*, 3rd edn. Springfield, Illinois pp

Espanol MT, Xu Y, Litt L et al (1994) Modulation of glutamate-induced intracellular energy failure in neonatal cerebral cortical slices by kynurenic acid, dizocilpine, and NBQX. *J Cereb Blood Flow Metab* 142:269-78.

Fatehi-Hassanabad Z, Tasker RA (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) activation confers functional neuroprotection in global ischemia. *Neurotox Res* 19:462-71.

Feig S, Lipton P (1990) N-methyl-D-aspartate receptor activation and Ca<sup>2+</sup> account for poor pyramidal cell structure in hippocampal slices. *J Neurochem* 55:473–483.

Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 475:412–426.

Frangogiannis NG (2007) Chemokines in ischemia and reperfusion injury *Thrombosis and Haemostasis* 97: 738-747.

Fukuda A, Czurk A, Hidal H et al (1995) Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition *Neurosci Lett* 184:13–16.

- Galimberti I, Gogolla N, Alberi S et al (2006) Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience *Neuron* 5:749–63
- Ghiselli A, Serafini M, Maiani G et al (1995) A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic Bio Med* 18:29-36.
- Giffen Macfarlane M and Weil-Malherbe H (1940) Changes in Phosphate Distribution During Anaerobic Glycolysis In Brain Slices. *Biochem. J.* 32:1-6.
- Glazer AN (1990) Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. *Method Enzymol* 186:161-168.
- Grace PA (1994) Ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery* 81:637-647.
- Grzesiak P, Słupecka-Ziemilska M, Woliński J (2016) The biological role of  $\alpha$ -ketoglutaric acid in physiological processes and its therapeutic potential. *Dev Period Med* 20:61-67.
- Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY et al (1996) Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *Stroke* 27:1657–1662.
- Gotes ME, Freyberger A, Riederer P (1990) Oxidative stress – A role in the pathogenesis of Parkinson diseases. *J Neural Trans* 529: 241-249.
- Guillen-Sans R, Guzman-Chozas M (1998) The thiobarbituric acid (TBA) reaction in food, *Crit.Rev Food Sci Nutr* 38: 315.
- Gul Z, Demircan C, Bagdas D et al (2016) Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. *Neurochemical Res* 41:2075–2085.
- GuttarLidge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41:1819-1828.
- Hajos N, Ellender TJ, Zemankovics R (2009) Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci* 29:319–327.
- Hajos N, Mody I (2009) Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying aCSF content. *J Neurosci Methods* 183:107–113.
- Hammes E, Hoffmann A, Plieth C et al (2005) Light-induced decrease in DCF fluorescence of wheat leaves in the presence of salicyl hydroxamate. *Protoplasma* 227:11-15.
- Harman AW, Maxwell MJ (1995) An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:129-144.

- Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR (1978) The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem. *J Mol Cell Cardiol* 10:641–68.
- Hershkowitz N, Katchman AN, Veregge S (1993) Site of synaptic depression during hypoxia: a patch-clamp analysis. *J Neurophysiol* 69:432-41.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L et al (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci* 96:3228-3233.
- Huang DJ, Ou BX, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 53:1841-1856.
- Huang X, Li Q, Zhang Y et al (2008) Neuroprotective Effects of Cactus Polysaccharide on Oxygen and Glucose Deprivation Induced Damage in Rat Brain Slices. *Cell Mol Neurobiol* 28:559–568.
- Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT (1993) A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 160:89–96.
- Isayama K, Pitts LH, Nishimura MC (1991) Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* 22:1394–1398.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295: 580 – 623.
- Joshi CN, Jain SK, Murthya PSR (2004) An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Research Protocols* 13:11 – 17.
- Kass IS, Abramowicz AE, Cottrell JE (1992) The barbiturate thiopental reduces ATP levels during anoxia but improves electrophysiological recovery and ionic homeostasis in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 49(3):537–543.
- Khurana S, Li WK (2013) Baptisms of fire or death knells for acute-slice physiology in the age of “omics” and light. *Rev. Neurosci* 24:527–536.
- Kreisman NR, Soliman S, Gozal D (2000) Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83(2):1031-1038.
- Kristian T, Seisjo BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29: 705-718.
- Kossenjans W, Rymaszewski Z, Barankiewicz J et al (1996) Menadione-induced oxidative stress in bovine heart microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 3: 39-47.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (1994) Çeviri Editörü: Uğur Çevikbaş. *Temel Patoloji. Beşinci Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi* 5:4–16
- Larkman AU, Mason A, Blakemore C (1988) The in vitro slice preparation for combined morphological and electrophysiological studies of rat visual cortex. *Neurosci Res* 6:1-19.

- Larkman AU, Jack JJ, Stratford KJ (1997) Quantal analysis of excitatory synapses in rat hippocampal CA1 in vitro during low-frequency depression. *J Physiol* 505:457-71.
- Lehmann A, Jacobson I (1990) Ion dependence and receptor mediation of glutamate toxicity in the immature rat hippocampal slice. *Eur J Neurosci* 2:620–628.
- Lein PJ, Barnhart CD, Pessah IN (2011) Acute hippocampal slice preparation and hippocampal slice cultures. *Methods Mol Biol* 758:115–134.
- Leybaert L, de Hemptinne A (1996) Changes of intracellular free calcium following mechanical injury in a spinal cord slice preparation. *Exp Brain Res* 112:392-402.
- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:227- 241.
- Li H, Colbourne F, Sun D, Zhao Z, Buchan AM (2000) Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31:176 – 182.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, and Buzsaki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339: 181–208.
- Lipton P, Aitken PG, Dudek FE et al (1995) Making the best of brain slices: comparing preparative methods. *Journal of Neuroscience Methods* 59:51-156.
- Lipton P, Whittingham T (1984) Energy metabolism and brain slice function. In: Dingledine R (ed) *Brain slices*, 1st edn. Plenum Press, New York.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79: 1431-1568.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lucchesi BR (1990) Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Ann Rev Physiol* 52:561-576.
- Magee JC, Avery RB, Christie BR (1996) Dihydropyridine-sensitive, voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels contribute to the resting intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 76:3460–3470.
- Mateos R, Goya L, Bravo L (2004) Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazone derivative: A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *Journal of Chromatography B* 805:33-39.
- Mateos R, Lecumberri E, Ramos S et al (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827:76-82.

- Matthews CC, Zielke HR, Parks DA (2003) Glutamate-pyruvate transaminase protects against glutamate toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 978:59–64.
- Mathews KS, McLaughlin DP, Ziabari LH et al (1999) Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining. *Journal of Neuroscience Methods* 102:43–51.
- McIlwain H, Cheshire J (1950) Metabolic maintenance of the inorganic and creatine phosphates of brain tissue in vitro. *Biochem J* 47:49.
- Miki S, Ashraf M, Salka S et al (2003) Myocardial dysfunction and ultrastructural alteration mediated by oxygen metabolites. *J Mol Cell Cardiol* 9:641–652.
- Moreira PI, Sayre LM, Zhu X et al (2010) Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease. *Methods Mol Biol* 610:419–434.
- Moyer J, Brown T (2002) Patch-clamp techniques applied to brain slices. In: Walz Wet al (eds) *Patch-clamp analysis: advanced techniques* 1th edn. Humana Press, Totowa, New Jersey
- Muller D, Buchs PA, Stoppini L (1993) Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 71:93–100.
- Nakamura T, Vollmar B, Vinning J, Ueda M, Menger M.D, Schafers H.J (2001) Heparin and the nonanticoagulant N-Acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann Thorac Surg* 72:1183–1189.
- Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB et al (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44(5):759–67.
- Nath KA, Ngo EO, Hebbel RP et al (1995) Alpha-Ketoacids scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 268:227–236.
- Neumar RW (2000) Molecular mechanism of ischemic neuronal injury *Annals of Emergency Medicine* 36:483–506.
- Newman GC, Hospod FE ve Wu P (1988) Thick Brain Slices Model the Ischemic Penumbra. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 8:586–597.
- Okuno S, Nakase H, Sakaki T (2013) Comparative study of 2,3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and hematoxylin–eosin staining for quantification of early brain ischemic injury in cats. *Neurological Research* 3:657–661.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem* 49:4619–26.
- Philips JW (1994) A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 42:441–448.

- Pringle AK, Sundstrom LE, Wilde GJ et al (1996) Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischaemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* 211:203-206.
- Ray AM, Owen DE, Evans ML et al (2000) Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. *Brain Res* 867:62- 69.
- Relton JK, Sloan KE, Frew EM et al (2001) Inhibition of  $\alpha 4$  integrin protects against transient focal ischemia in normal and hypertensive rats. *Stroke* 32:199 – 205.
- Rice ME (1999) Use of ascorbate in the preparation and maintenance of brain slices. *Methods* 18:144–149.
- Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J et al (2005) The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology and Medicine* 39: 26-50.
- Sandritter W, Jestadt R (1958) Triphenyltetrazolium chloride (TTC) als Reduktions-indikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 41:165 – 177.
- Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW et al (1989) Inhibition of Superoxide and Ferritin-dependent Lipid Peroxidation by Ceruloplasmin. *The Journal of Biological Chemistry* 264:21-26.
- Sans N, Diez-Fernands C, Fernández-Simón L et al (1995) Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA piody in liver. *Carcinogenesis* 16: 1585-1593.
- Satpute R, Lomash V, Kaushal M et al (2013) Neuroprotective effects of  $\alpha$ -ketoglutarate and ethyl pyruvate against motor dysfunction and oxidative changes caused by repeated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure in mice. *Hum Exp Toxicol* 32:747-58.
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanism of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of Molecular Medicine* 78:3-13.
- Slater TF (1984) Free radicals mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 222:1–15.
- Seekamp A, Warren JS, Remick DG et al (1993) Requirements of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury associated with lung injury. *American Journal of Pathology* 143: 453-463.
- Schurr A, Reid KH, Tseng M et al (1984) The stability of the hippocampal slice preparation: an electrophysiological and ultrastructural analysis. *Brain Res* 297:357-362.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ et al (1997) Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. *J Neurochem* 69:423–426.



- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM et al (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23:10756-10764.
- Sjodin T, Westing YH, Apple FS (1990) Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10: 236-254.
- Skillen AW (1984) Clinical biochemistry of lactate dehydrogenase. *Cell and Biochemistry and Function* 2: 140-144.
- Suttner J, Cermak J, Dyr E (1997) Improvement in the HPLC malondialdehyde level determination in normal human plasma, *Anal Biochem* 249:20-30.
- Swarnkar S, Singha S, Mathur R et al (2010) A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. *Toxicology* 272:17–22.
- Thomas CE, Morehouse LA, Aust SD (1985) Ferritin and Superoxide-dependent Lipid Peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 260:3275-3280
- Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA et al (2004) Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *Journal of Neuroscience Methods* 139:203–207.
- Wayner DD, Burton GW, Ingold KU et al (1985) Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human-Blood Plasma by Controlled Peroxidation - the Important Contribution Made by Plasma-Proteins. *Febs Lett* 187:33-37.
- Wang ZJ, Li GM, Nie BM et al (2006) Neuroprotective effect of the stearic acid against oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Chem Biol Interact* 160:80-7.
- Woolf N (1992) Ischemia and infarction Ed: Jod MG, Isaacson PG, Wright NA Oxford Textbook of Pathology, Oxford University Press Oxford pp 524-530
- Wu CP, Shen H, Luk WP et al (2002) A fundamental oscillatory state of isolated rodent hippocampus. *J Physiol* 540: 509 –527.
- Wu C, Luk W.P, Gillis J et al (2005) Size Does Matter: Generation of Intrinsic Network Rhythms in Thick Mouse Hippocampal Slices. *J Neurophysiol* 93: 2302–2317.
- Xue QS, Yu BW, Wang ZJ et al (2010) Effects of ketamin, midazolom, thiopental and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices. *Acta Pharmacol Sin* 25:115-120.
- Valentovic MA, Ball JG (1998) 2-Aminophenol and 4-aminophenol toxicity in renal slices from Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 55: 225-240.

Varming T, Drejer J, Frandsen A et al (1996) Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide: protection by nifedipine and MK-80. *J Neurosci Res* 44:40–46.

Vinten-Johansen J (2004) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 61:481-497.

Volpi N, Tarugi P (1998) Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct. *J Chromatogr B* 713: 433-443.

Valkonen M, Kuusi T (1997) Spectrophotometric assay for total radical trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research* 38:823- 833.

Yang Y, Shuaib A, Li Q (1998) Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J Neurosci Methods* 84:9–16 26.

Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y et al (2001) Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke* 32:232 – 239.

Zelzer S, Oberreither R, Bernecker C, Stelzer I et al (2013) Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry comparison with high-performance liquid chromatography methodology. *Free Radic Res* 47:651-656.

Zhu XY, Ma PS, Wu W et al (2016) Neuroprotective actions of taurine on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Brain Res Bull* 124:295-305.

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

- ATP: Adenozin trifosfat  
DCF: 2,7-diklorofloresin  
DCFH-DA: 2,7- diklorofloresin-diasetat  
DMSO  
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazin  
H&E: Hematoksilen-eozin  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi  
İ/R: İskemi/reperfüzyon  
LDH: Laktat dehidrojenaz  
LDL: Düşük dansiteli lipoproteinler  
MDA: Malondialdehid  
NF-κB: Nükleer faktör-kappaB  
NO: Nitrik oksid  
ORAC: Oksijen radikal absorban kapasitesi  
PAF: Platelet aktive edici faktör  
ROS: Serbest oksijen radikalleri  
TBARS: Tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler  
TBA: Tiyobarbitürik asit  
TRAP: Toplam radikal yakalayıcı parametre  
TTC: 2, 3, 5-trifeniltetrazolium klorür

## 8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her türlü bilimsel bilgi, uygulama becerisi eğitimi, deneyim desteği gördüğüm, başladığım günden itibaren fikirlerimi paylaşmam ve tartışarak geliştirebilmem için bana hoşgörü gösteren, cesaret veren ve hipotezlerimin peşinde koşabilmem için güven aşılayan tez danışmanım Prof. Dr. R. Levent Büyükuysal'a, kendilerinden doktora dersi aldığım ayrıca seminer ve makale sunumlarımda geliştirici ve eğitici notlarıyla gelişmemde katkısı olan Tıbbi Farmakoloji Anabilimdalı üyeleri Prof. Dr. Vahide Savcı, Prof. Dr. Mine Sibel Gürün, Prof. Dr. Sinan Çavun, Prof. Dr. Gökhan Göktalay, Prof. Dr. Mehmet Cansev, Doç. Dr. Sertaç Yılmaz, Kimyager Sami Aydın'a, eğitimim süresince tüm bilgisini benimle paylaşan ve yol gösteren Doç. Dr. Deniz Bağdaş'a, beraber çalıştığım ve desteklerini gördüğüm anabilim dalı araştırma görevlilerine, doktora ve yüksek lisans öğrencileri ile personeline, bu zorlu eğitim süresince bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

HDP(T)-2014/33 numaralı proje ile tezimi destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1987 Diyarbakır doğumluyum. İlk, orta ve lise eğitimimi Diyarbakır'da tamamladım. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden mezun oldum. 2008- 2012 yılları arasında Deva Eczanesi sahibi ve eczacısı olarak çalıştım. 2012 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2012 yılından beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında doktora eğitimimi sürdürmekteyim. 2013 yılından itibaren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

### Ödüller:

**Zülfiye GÜL-** Poster Tebliğ - Society of Cell Membranes and Free Oxygen Radicals -1st Honorable Mention Poster Award

Bagdas D, Cam Etoz B, **Gul Z**, Ziyank S, Inan S, Gul NY, Topal A, Cinkilic N, Tas S, Ozyigit MO, Turacozen O, Gurun MS. Enhanced antioxidant defense by Chlorogenic acid accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research, Vol 6, Number 1, pp 352, September 9-12, 2014 Isparta, TURKEY

### A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

**A1.** Bagdas D, Cam B, **Gul Z**, Tyndal R, Buyukuysal RL, Damaj MI, Gurun MS. Menthol induces sex-related differences on nicotine intake in rats. Nicotine & Tobacco Research. (yayın aşamasında)

**A2.** Bagdas D, Wilkerson J, Kulkarni A, Toma Wisam, AlSharari Shakir, **Gul Z**, Lichtman A, Papke R, Thakur G, Damaj MI. The  $\alpha 7$  nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. British Journal of Pharmacology. 2016 Aug;173(16):2506-20. DOI: 10.1111/bph.13528.

**A3.** **Gul Z**, Bagdas D, Buyukuysal RL. Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. Neurochemical Research. 2016 Aug;41(8):2075-85. DOI: 10.1007/s11064-016-1919-8.

**A4.** Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabacı E, **Gul Z**, Cavus S. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. Cryobiology. 2016 Jun;72(3):269-73. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.007.

**A5.** Topyıldız F, Kızılcı S, **Gul Z**, Sigirli D, Guclu M, Kisakol G, Cavun S. Exenatide treatment causes prolonged suppression of serum ghrelin levels following mixed meal test. Journal of Diabetes Research. 2016;2016:1309502. DOI: 10.1155/2016/1309502.

**A6.** Ustuner B, Alcay S, Toker MB, Nur Z, Gokce E, Sonat F, **Gul Z**, Duman M, Ceniz C, Uslu A, Sagirkaya H, Soylu MK. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Reproduction Science*. 2016 Jan;164:97-104. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.11.017.

**A7.** Bagdas D, Cam Etoz B, **Gul Z**, Ozyigit MO, Cinkilic N, Inan Ozturkoglu S, Isbil Buyukcoskun N, Ozluk K, Gurun MS. Chlorogenic Acid enhances abdominal skin flap survival based on superficial inferior epigastric artery in nondiabetic and diabetic rats. *Annals of Plastic Surgery*.2016 Aug;77(2):e21-5.

**A8.** Bagdas D, Cam Etoz B, **Gul Z**, Ziyankok S, Inan S, Gul NY, Topal A, Cinkilic N, Tas S, Ozyigit MO, Turacozen O, Gurun MS. Enhanced antioxidant defense may induce beneficial effects on wound healing in diabetic rats: an example treatment with Chlorogenic acid. *Food Chem Toxicol*. 81: 54-61, 2015.

**A9.** Bagdas D, Gul NY, Topal A, Tas S, Ozyigit MO, Cinkilic N, **Gul Z**, Cam Etoz B, Ziyankok S, Inan Ozturkoglu S, Turacozen O, Gurun MS. Pharmacologic overview of systemic Chlorogenic Acid therapy on experimental wound healing. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 387(11):1101-16, 2014.

**A10.** Demircan C, **Gul Z**, Buyukuysal RL. High Glutamate Attenuates S100B and LDH Outputs from Rat Cortical Slices Enhanced by Either Oxygen-Glucose Deprivation or Menadione. *Neurochem. Res*. 2014 (07) ;39(7):1232-44.

**A11.** Bagdas D, Cam Etoz B, Inan Ozturkoglu S, Cinkilic N, Ozyigit MO, **Gul Z**, Isbil Buyukcoskun N, Ozluk K, Gurun MS. Effects of systemic Chlorogenic Acid on random-pattern dorsal skin flap survival in diabetic rats. *Biol Pharm Bull*. 37(3): 361–370, 2014.

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

**B1.** Guclu M, Kiyici S, **Gul Z**, Cavun S. Exenatide treatment causes suppression of serum fasting ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. 19th European Congress of Endocrinology, Abstract book p-105, 2017 Lisbon, Portugal, (Poster tebliğ).

**B2.** Uygun B, Kiyici S, Ozmen S, **Gul Z**, Sigirli D, Cavun S. The association between olfaction and taste functions with serum ghrelin and leptin levels in obese women. 19th European Congress of Endocrinology, Abstract book p-112, 2017 Lisbon, Portugal, (Poster tebliğ).

**B3.** **Gul Z**, Ozer AM, Buyukuysal RL. Kisspeptin stimulates noradrenaline release in medial preoptic area of female the rats. 17th European Congress of Neuroendocrinology, Abstract book p-58, 2015 Milan, İtalya (Poster tebliğ).

**B4.** Topyildız F, Kiyici S, **Gul Z**, Sigirli D, Guclu M, Kisakol O, Cavun S. The effect of exenatide treatment on serum ghrelin levels in patients with type 2 diabetes. 17th European Congress of Endocrinology, Abstract book p-452, 2015 Dublin, İrlanda, (Poster tebliğ).

**B5.** Bagdas D, Cam Etoz B, **Gul Z**, Ziyank S, Inan S, Gul NY, Topal A, Cinkilic N, Tas S, Ozyigit MO, Turacozen O, Gurun MS. Enhanced antioxidant defense by Chlorogenic acid accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research, Vol 6, Number 1, pp 352, September 9-12, 2014 Isparta, Turkey, (Poster tebliğ).

**B6.** **Gul Z**, Buyukuysal RL. Number of the slices in the medium alters staining of the cortical slices with 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride under normoxic or oxygen-glucose deprived conditions. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Cell Membranes and Free Radical Research, Vol 6, Number 1, pp 353, September 9-12, 2014 Isparta, Turkey, (Poster tebliğ).

**C1. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar: ---**

**C2. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplarda bölümler:**

**D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

**D1.** **Gul Z**, Buyukuysal RL. İlaç etkileşmeleri ve etkileşmenin klinik önemini arttıran faktörler. Türkiye Klinikleri J. Pharmacol-Special Topics 5(3):129-37, 2017.

**D2.** **Gul Z**, Buyukuysal RL. İlaç etkileşmelerinin önemini arttıran faktörler ve sık karşılaşılan etkileşme tabloları ile ilgili örnekler. Türkiye Klinikleri J. Pharmacol-Special Topics 5(3):198-212, 2017.

**D1.** Ak-Sonat F, Bağdaş D, **Gul Z**, Gozalp RG. Tavşanlarda orta dönem gebeliklerin sonlandırılmasında kullanılan Aglepriston'un bazı oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi. U.Ü. Vet. Fak. Derg. 32(2), 1-6, 2013.

**E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

**E1.** **Gul Z**, Bagdas D, Buyukuysal RL. Sıçan kortikal dilimlerinde iki farklı model ile oluşturulan oksidatif strese karşı klorojenik asit ve metabolitlerinin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması. Türk Farmakoloji Derneği, 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kongre Programı ve Bildiri Özet Kitabı, sf 100, 7 – 10 Eylül 2015, Ankara, Türkiye (Oral tebliğ).

**E2.** **Gul Z**, Bagdas D, Buyukuysal RL. Klorojenik asidin oksidatif stres üzerine nöroprotektif etkisi: resveratrol ile karşılaştırılması. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi. 30 Nisan - 3 Mayıs 2015, Konya, Türkiye (Poster tebliğ).

**E3.** Sevdar G, **Gul Z**, Buyukuysal RL, Cavun S. The effects of Gly-Gln dipeptide on ischemia-reperfusion injury in rat brain cortical slice.13. National Congress of Neuroscience. Abstract book p181. April 2015, Konya, Türkiye (Poster tebliğ).

**E4.** Bagdas D, am Etöz B, Özyiğit MO, inkili N, **Gul Z**, İnan Öztürkoğlu S, İşbil Büyükçoşkun N, Özlük K, Gürün MS. Klorojenik asidin diyabetik sıçanlarda oluşturulan aksiyel paternli epigastrik cilt flebi modelinde flap yaşayabilirliği üzerine etkisi. Türk Farmakoloji Derneği, 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kongre Programı ve Bildiri Özet Kitabı, sf 378-379, 4 – 7 Kasım 2013, Antalya, Türkiye (Poster tebliğ).

**E5.** Bagdas D, Gul NY, Topal A, Taş S, Özyiğit MÖ, inkili N, **Gul Z**, Etoz B, Ziyanok S, İnan Öztürkoğlu S, Turaözen Ö, Gürün MS. Klorojenik asidin sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkisi. IV. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Kongre Kitabı, sf 38-39, 11 – 14 Eylül 2013, Elazığ, Türkiye (Oral tebliğ).

F. Sanat ve Tasarım Etkinlikleri: ---

#### **G. Diğer yayımlar:**

**G1.** **Gul Z**, Demircan C, Buyukuysal RL. Doku içermeyen fizyolojik ortamda 2,7-Dichlorofluorescein ile antioksidan etkinliğin ölçülebilirliği. Uludağ Üniversitesi V. Bilgilendirme ve Ar-Ge Günleri, Poster Sunumları, sf 317, 12-14 Kasım 2015, Bursa, Türkiye, (Poster tebliğ).