



Araştırma Yazısı

Mannitol ve C Vitamininin Siyatik Sinir Crush Hasarı Üzerine Nöroprotektif Etkileri; Deneysel Sıçan Çalışması

Zeki YILMAZ¹, Mehmet ŞENOĞLU¹, Ergül Belge KURUTAŞ², Harun ÇIRALIK³, Davut ÖZBAĞ⁴

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin Cerrahisi, Kahramanmaraş, Türkiye ²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya, Kahramanmaraş, Türkiye ³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji, Kahramanmaraş, Türkiye ⁴Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi, Kahramanmaraş, Türkiye

Özet

Giriş: Bu çalışmada siyatik sinir crush hasarı modelinde, mannitol ve C vitamininin erken ve geç dönemde nöroprotektif etkinliği araştırıldı.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada 60 adet sıçan kullanıldı. Denekler; Sham (grup 1) Kontrol (grup 2), Mannitol (0.5 gr/kg) 1. saat (grup 3), C vitamini (100mg/kg) 1. Saat (grup 4), Mannitol 24. Saat (grup 5) ve C vitamini 24. Saat (grup 6) olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Tüm gruplarda biyokimyasal çalışmalar ve histopatolojik inceleme için siyatik sinir doku örnekleri alındı. Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ve lipid peroksit ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüldü.

Bulgular: Mannitol tedavisi verilen gruplar (grup 3, grup 5) kontrol (grup 2) grubuyla karşılaştırıldığında SOD ve CAT enzim aktivitelerinin erken (grup 3, p<0.05) ve geç (grup 5, p<0.05) dönemde anlamlı olarak arttığı ve MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. Yine C vitamini tedavisi verilen gruplar (grup 4, grup 6) kontrol (grup 2) grubuyla karşılaştırıldığında CAT enzim aktivitelerinin erken (grup 4, p<0.05) ve geç (grup 6, p<0.05) dönemde anlamlı olarak arttığı ve MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. SOD enzim aktivitesi düzeyi ise kontrol grubuyla kıyaslandığında erken (grup 4, p<0.05) dönemde anlamlı şekilde arttığı görülmektedir.

Sonuç: C vitamini veya mannitol kullanımının periferik sinirlerde hasar sonrası oluşan oksidatif stresi önlemede erken ve geç dönemde yararlı olduğu, mannitolün geç dönem nöroprotektif etkisinin daha fazla olabileceği tesbit edildi. Fakat geniş kapsamlı, daha farklı doz ve sürelerde çalışılmasının daha verimli olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Siyatik sinir, C vitamini, mannitol

Neuroprotective Effects of Mannitol And Vitamin C on Crush Injury of Sciatic Nerve; An Experimental Rat Study

Abstract

In this experimental sciatic nerve crush injury model study, early and late neuroprotective efficacy of mannitol and vitamin C.

In this study 60 male rats were used. The subjects were divided into 6 groups as Sham group (Group 1), Control group (Group 2), 1. hour mannitol group (Group 3), 1. hour vitamin C group (Group 4), 24. hour mannitol group (Group 5) and 24. hour vitamin C group (Group 6). At the end of the experimental period, tissue samples were taken for histopathological and

biochemical studies. Lipid peroxide product malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities were measured.

After mannitol treatment tissue SOD and CAT activities increased and MDA level decreased significantly, at the early period (group III, $p < 0.05$) and on the late period (group IV, $p < 0.05$) than control (group 2) group. And after mannitol treatment tissue CAT activities increased and MDA level decreased significantly, at the early period (group IV, $p < 0.05$) and on the late period (Group VI, $p < 0.05$) than control (group 2) group. However, SOD activities increased in early period (group IV, $p < 0.05$).

As a result, it was found that application of vitamin c and mannitol intraperitoneally, may be useful on preventing oxidative stress and also mannitol has more neuroprotective efficacy at late period than early period. However, it was concluded that different dose and duration of working in other comprehensive studies might be more beneficial.

Keywords: Sciatic nerve, vitamin C, mannitol

GİRİŞ

Periferik sinirlerdeki yaralanmalar sinirde gerilme, ezilme ve kesilme nedeniyle meydana gelmekte ve yaralanmayla beraber sinirin distal ve proksimal uçlarında önemli histopatolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bazı sinir yaralanmalarında yaralı bölgenin distalinde, akson ve miyelin kılıfın fiziksel fragmentasyonu ve aksonal yapının tamamen bozulması ile karakterize olan Wallerian dejenerasyonu meydana gelmekte ve buna bağlı olarak sinir yaralanmasından sonraki ilk 48-96 saat içinde akson devamlılığı kaybolarak impuls iletimi bozulmaktadır^(6,23).

Periferik sinirin ezilme tarzındaki hasarlanmalarında klinik tablo, sinirin lokalize olduğu bölgeye, ezilme oluşturan basınca, basıncın oluşturduğu şiddet etkisine ve ezilme oluşturan basıncın etki süresine bağlıdır. Sinirlerdeki ezilmeye bağlı olarak sinir üzerinde mekanik iletim bloğu ve mikrovaskülerizasyon üzerinde blok oluşmaktadır. Daha sonra sinir doku üzerinde basının azalmasıyla oluşan reperfüzyon, ortama fazla miktarda oksijen ve besin maddelerinin yüksek basınçla geri göllenmesine yol açmakta ve yüksek miktarda serbest radikal (SR) oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan bu (SR) dokudaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve

böylece doku üzerinde yıkıcı etkiler oluşturmaktadır^(17,24).

Sinir rejenerasyonunun artırılmasında, başlıca nörotropik faktörler⁽²¹⁾, steroidler, hormonlar, çeşitli kimyasal maddeler ve düşük frekanslı manyetik alan uygulamalarının etkinliği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir^(2,18).

Periferik sinirlerdeki yaralanma sonrası doku destrüksiyonundan dolayı serbest oksijen radikalleri artarak doku hasarına neden olduğu bilinmektedir. Birçok yeni ajan da yapılan çalışmalarda antioksidan etkileri tespit edilmesi sebebiyle periferik sinir rejenerasyonu tedavisinde kullanılmakta veya test edilmektedir.

Mannitol, kafa travmalarında yaygın olarak kullanılan antiödem etkisinin yanında antioksidan etkileri de vardır. Ayrıca mannitol (SR)' i temizler. İskemi sırasında nötrofillerin kapiller damarlarda oluşturdıkları tıkaçları çözer ve kan akımını düzenler⁽¹³⁾.

C vitamini suda çözünebilen bir serbest radikal toplayıcısıdır. Dihidroaskorbata dönüşerek serbest radikalleri indirger. Kollajen yapısında yer alan prolin ve hidroksi prolinin hidroksilasyonunda ve öteki hidroksilasyon reaksiyonlarında rol oynadığı bilinmektedir⁽⁸⁾.

Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan deneysel crush tipi siyatik sinir yaralanması modelinde, mannitol ve C

vitamininin erken ve geç dönem nöroprotektif etkilerinin, ışık mikroskopisi ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyallerin Temini

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan 12.10.2010 tarihinde ve 2010/5/4 Sayılı izin alındı. Çalışmamızda her grupta 10 adet olacak şekilde 6 gruba ayrılan toplam 60 adet 250-300 g ağırlığındaki Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deney süresince sıçanlar $20-22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık siklusunda ve %50-60 nem ortamında barındırıldı. Hayvanlar standart pelet rat yemi ve su ile beslendiler.

Grup 1 (Sham grubu=S): Siyatik sinir hasarı oluşturulmayan, hayvan anestezi altındayken İntraperitoneal (i.p.) Serum fizyolojik verilen daha sonra siyatik sinir eksplore edilip sonra kapatılan ve deney sonunda siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 2 (Kontrol grubu=K): Hayvan anestezi altındayken i.p. Serum fizyolojik verilen daha sonra siyatik sinirin olduğu bölge açılarak Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) ile 90 saniye Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulan ve hasardan 1 saat sonra Siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 3 (Mannitol 1. saat=M1): Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan 24 saat önce ve Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulması esnasında İntraperitoneal Mannitol (0.5 gr/kg) verilen, deney esnasında Siyatik sinir ortaya konularak Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) ile 90 saniye Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulan ve hasardan 1 saat sonra Siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 4 (C vitamini 1. saat=C1): Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan 24 saat önce ve Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulması esnasında İntraperitoneal C vitamini (100mg/kg) verilen, deney esnasında Siyatik sinir ortaya konularak Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) ile 90 saniye Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulan ve hasardan 1 saat sonra siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 5 (Mannitol 24. saat=M2): Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan 24 saat önce ve Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulması esnasında İntraperitoneal Mannitol (0.5 gr/kg) verilen, deney esnasında Siyatik sinir ortaya konularak Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) ile 90 saniye Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulan ve hasardan 24 saat sonra Siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Grup 6 (C vitamini 24. saat=C2): Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulmadan 24 saat önce ve Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulması esnasında İntraperitoneal C vitamini (100mg/kg) verilen, deney esnasında Siyatik sinir ortaya konularak Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) ile 90 saniye Crush tipi Siyatik sinir hasarı oluşturulan ve hasardan 24 saat sonra Siyatik sinir doku örnekleri alınan gruptur.

Bu çalışmada kullanılan ilaçlar: Deney Grubu İlaçları; Redoksan İV Ampul (Vitamin C "Askorbik Asit" Ampul Roche, İsviçre), Mannitol %20'lik Medifleks (Her 100 mL'lik solüsyonda, Mannitol 20 gr + Enjeksiyonluk su izotonik= %0,9 NaCl solüsyonun Osmolaritesi: 1100 mOsm/L).

SİYATİK SİNİR HASARI MODELİ VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Deneyde kullanılan hayvanlara İntraperitoneal yoldan 30-40 mg/kg dozunda Tiopental Sodium (Pentotal sodium Abbott, İtalya) ile anestezi sağlandıktan sonra pron pozisyonunda tespit edilerek operasyon sahası, Povidone İdine serub (MEDICA brush; %4 chlohexidine scrub, MEDICA BV, Hollanda) ile 10

dakika fırçalandı ve %10 povidone iodine solusyonu (POVİOD; Saba. Türkiye) ile dezenfekte edildi. Ayrıca sıçanlara operasyondan 30 dakika önce, profilaktik antibiyotik olarak tek doz 50 mg/kg Seftriakson (Rocephin flk Roche, İsviçre), intraperitoneal olarak verildi. Sol siyatik sinir cerrahi mikroskop kullanılarak orta gluteal bölgede biceps kası disseksiyonu yapılarak ortaya konuldu. Kanamalar bipolar koter yardımıyla kontrol altına alınarak iyi bir hemostaz sağlandı. Cerrahi mikroskop altında Kuyumcu forsepsi (Jeweler's forceps) kullanılarak sol siyatik sinirde 90 saniye baskıya bağlı crush tipi hasar oluşturulduktan sonra kesitin çevresindeki kas dokusu 5.0 ipek sütür kullanılarak işaretlendi. Crush hasar sonrası yaklaşık 1 cm siyatik sinir doku örneği alınarak histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için eşit iki parçaya ayrılarak saklandı. Deney esnasında kullanılan hayvanların hiçbirisi ölmedi.

Histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri % 10'luk formaldehit içinde fikse edilerek saklanırken, biyokimyasal inceleme için alınan doku örnekleri, serum fizyolojik içeren endorf tüpleri içinde - 20 °C de çalışma zamanına kadar bekletildi.

Biyokimyasal Analizler

Homajenatların Hazırlanması:

Ratlardan alınan dokular soğuk %1.15 M KCl homojenize edildi. Homojenatlar 14.000 x rpm'de +4 °C 45 dakika soğuk santrifüj edilmesi sonrasında oluşan süpernatantlar endorf tüplere ayrıldı. Elde edilen bu süpernatantlarda Malondialdehit (MDA) düzeyi ile Katalaz (CAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

Süperoksit dismutaz tayini:

Dokularda SOD aktivitesi Fridovich⁽¹⁰⁾ yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, p-iyodonitrotetrazolium viyole (INT) ile

meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansite (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Dokularda SOD aktivite sonuçları Ü/mg protein olarak verildi.

Katalaz tayini: CAT enzim düzeyi tayininde Beutler⁽⁴⁾ yöntemi kullanıldı. 230 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi. CAT aktivite sonuçları Ü/mg protein verildi.

Malondialdehit Tayini:

Siyatik sinir dokularında MDA düzeyi Ohkawa yöntemiyle⁽²⁰⁾ saptanmıştır. Bu yöntem, aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95°C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanmaktadır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılı olup 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda MDA düzeyleri sonuçları nmol/mg protein verildi.

Histopatolojik Analiz:

Siyatik sinir dokusundan enine alınan örneklerin histopatolojik incelenmesi için, doku kesitleri % 10'luk formaldehit içine alındı. Doku kesitleri Haris hematoksilin-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda önce (x40) daha sonra (x100), (x200) ve (x400) büyütme yapılarak değerlendirildi. Mikroskop altında dokuların resimleri çekildi.

İstatistik:

İstatistiksel analizin yapılmasında SPSS programı kullanıldı. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bu değerlendirmede p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

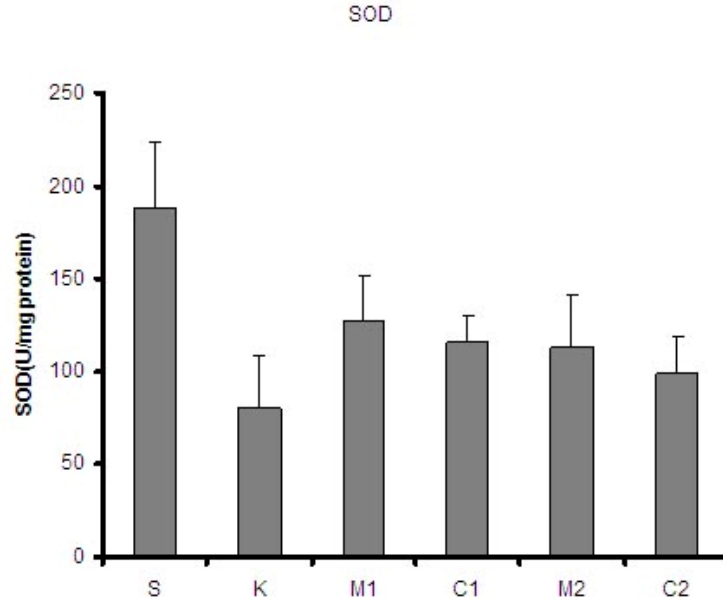
BULGULAR

Sham grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında; kontrol grubunda SOD ve

CAT enzim aktivitesi düzeylerinin azaldığı, MDA düzeyinin yükseldiği görülmektedir ($p<0,05$). Bu durum siyatik sinirdeki crush hasarı göstermektedir.

SOD AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLER

Bu çalışmada alınan Siyatik sinir dokularında ortalama SOD değerleri hesaplandığında en düşük SOD değerinin Kontrol grubunda (80,3 U/mg protein) olduğu en yüksek değer ise Sham grubunda (188,3 U/mg protein) olduğu tespit edildi.



Şekil 1: Gruplarda SOD aktivitesi ölçümü (U/mg protein)

**Tedavi gruplarından Mannitol 1. saat(M1), Mannitol 24. saat(M2) ve C vitamini 1. saat(C1) gruplarında ve Sham(S) grubunda, Kontrol(K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölçüldü ($p<0,05$).

1-Mannitol 1.saat grubu(M1) ile Kontrol grubu(K) SOD seviyesi karşılaştırıldı; M1 grubunda Kontrol grubuna(K) göre daha yüksek, istatistik olarak ta bu fark anlamlı kabul edilmiştir ($p=0,02$). M1 grubu ile Sham(S) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü($p=0,529$). M1 grubu ile M2 grubu SOD seviyesi karşılaştırıldığında, M1 grubunda daha

yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P=0,01$).

2- C vitamini 1. saat grubu(C1) ve Kontrol(K) grubu SOD değerleri karşılaştırıldı. C1 grubunda anlamlı olarak yüksek ölçüldü ($p=0,03$). C1 grubu ve C2 grubu SOD değerleri açısından karşılaştırdı. İstatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($P=0,82$).

3- Mannitol 24.saat grubu(M2) ile Kontrol grubu(K) SOD seviyesi karşılaştırıldı; M2 grubunda Kontrol grubuna göre daha yüksek, istatistik olarak ta bu fark anlamlı kabul edilmiştir ($p=0,00$). M2 grubu ile Sham(S) grubu karşılaştırıldığında,

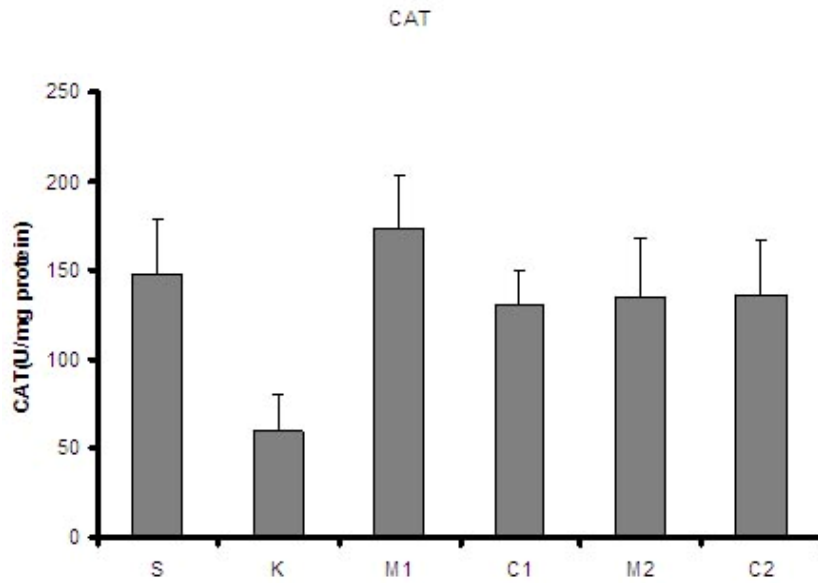
sham(S) grubunda daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,001$).

4- C vitamini 24. saat grubu(C2) ve Kontrol(K) grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.161$).

5- Sham grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek ölçülmüş, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p=0,021$)

CAT AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER

Bu çalışmada alınan Siyatik sinir dokularında ortalama CAT değerleri hesaplandığında en düşük CAT değerinin Kontrol grubunda (59,9 U/mg protein) olduğu en yüksek CAT değerin ise Mannitol 1. saat(M1) grubunda (173,9 U/mg protein) olduğu tespit edildi.



Şekil 2: Gruplarda CAT aktivitesi ölçümü(U/mg protein)

****Bütün tedavi gruplarından (Mannitol 1. saat(M1), Mannitol 24. saat(M2), C vitamini 1. saat(C1) ve C vitamini 24.saat(C2)) ve Sham(S) grubunda, Kontrol(K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölçüldü ($p<0.05$).**

1- Mannitol 1.saat grubu(M1) ile Kontrol grubu(K) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,00$). M1 grubu ile Sham grubu arasındaki fark ta istatistiksel olarak anlamlı bulundu(0,019). M1 grubu ve M2 grubu arasında

istatistiksel olarak anlamlı fark yok ($p=0,734$).

2- C vitamini 1. saat grubu(C1) ve Kontrol grubu(K) CAT değerleri karşılaştırıldı. C1 grubunda anlamlı olarak yüksek ölçüldü ($p=0,00$). C1 grubu ve C2 grubu CAT değerleri açısından karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı fark yok ($P=0,834$).

3- Mannitol 24.saat grubu(M2) ile Kontrol grubu(K) karşılaştırıldığında, M2 grubunda K grubuna göre daha yüksek ölçüldüğü ve istatistiksel olarak ta bu farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,00$). M2 grubu ile S

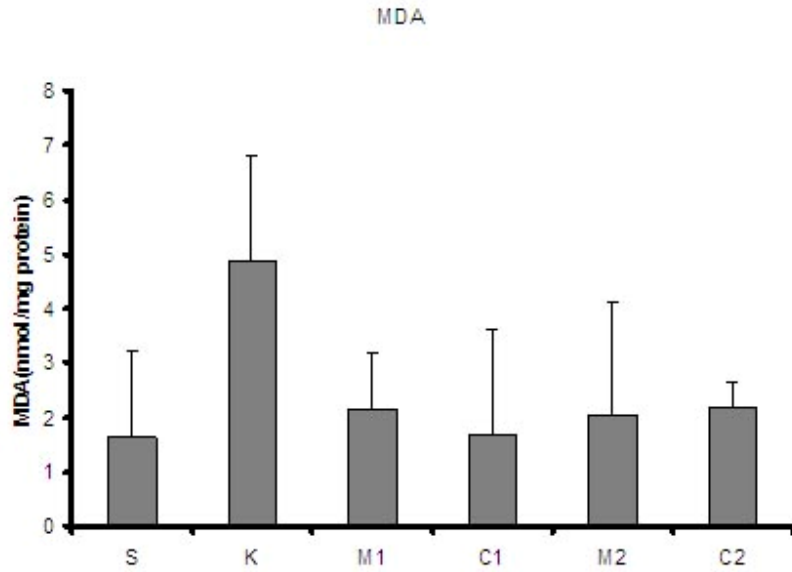
grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü($p=0,345$).

4- C vitamini 24. saat grubu(C2) ve Kontrol(K) grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,00$).

5- Sham grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek ölçülmüş, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p=0,00$).

MDA DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLER

Bu çalışmada alınan Siyatik sinir dokularında ortalama MDA değerleri hesaplandığında en düşük MDA değerinin Sham grubunda (1,61 nmol/mg protein) olduğu en yüksek MDA değerin ise Kontrol grubunda (4,87 nmol/mg protein) olduğu tespit edildi.



Şekil 3: Gruplarda MDA miktarı ölçümü(nmol/mg protein)

**Bütün tedavi gruplarından (Mannitol 1. saat(M1), Mannitol 24. saat(M2), C vitamini 1. saat(C1) ve C vitamini 24.saat(C2)) ve Sham(S) grubunda, Kontrol(K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ölçüldü ($p<0.05$).

1- Mannitol 1.saat grubu(M1) ile Kontrol grubu(K) arasındaki fark MDA düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bulundu(0,02). M1 grubu ile Sham grubu arasında($p=345$) ve M1 grubu ile M2 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,059$).

2- C vitamini 1. saat grubu(C1) ve Kontrol grubu(K) MDA değerleri karşılaştırıldı. C1 grubunda anlamlı olarak yüksek ölçüldü ($p=0,01$). C1 grubu ve C2 grubu MDA

değerleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,130$).

3- Mannitol 24.saat grubu(M2) ile Kontrol grubu(K) karşılaştırıldığında, M2 grubunda K grubuna göre daha yüksek ölçüldüğü ve istatistiksel olarak ta bu farkın anlamlı olduğu görüldü ($p=0,00$). M2 grubu ile S grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,096$).

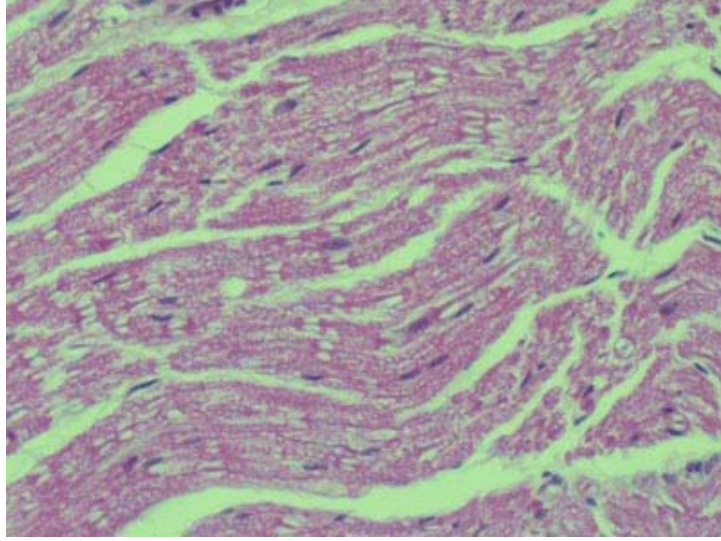
4- C vitamini 24. saat grubu(C2) ve Kontrol(K) grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$).

5- Sham grubunda kontrol grubuna göre daha düşük ölçülmüş, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p=0,01$).

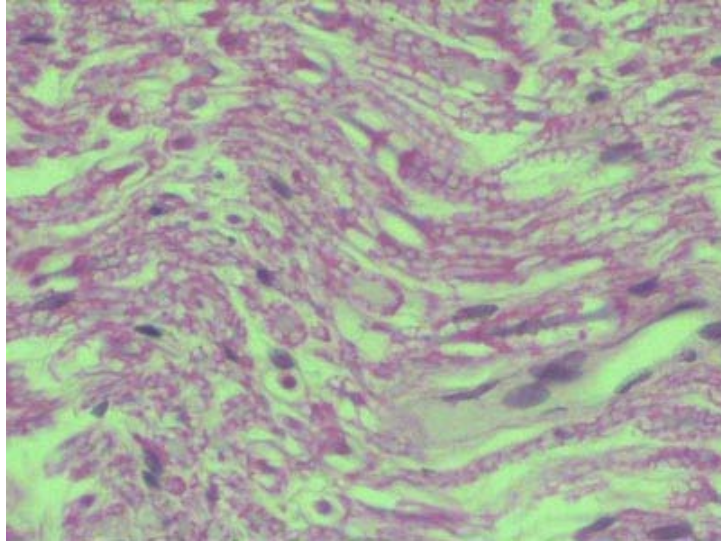
HİSTOPATOLOJİK İNCELEME BULGULARI

Dokuların histopatolojik incelemeleri doku kesitleri hazırlanarak ışık mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. İlaç verilen gruplar, kontrol grubu ve sham grubundan

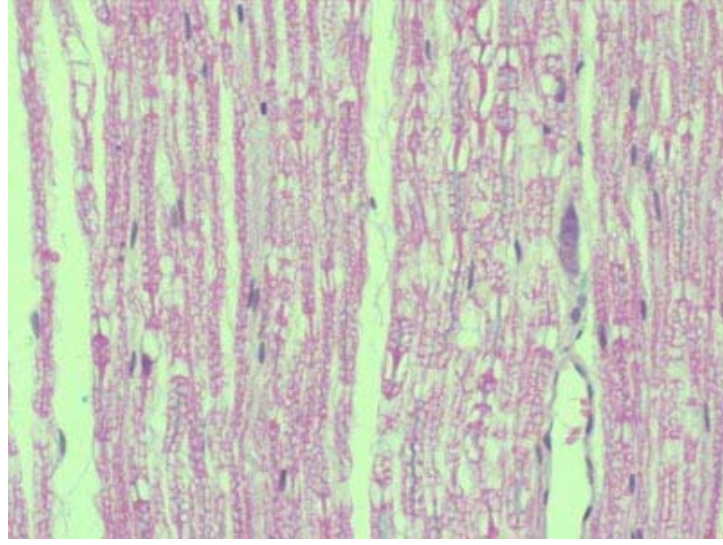
alınan doku kesitleri, kendi aralarında karşılaştırmaları yapıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4,5,6,7).



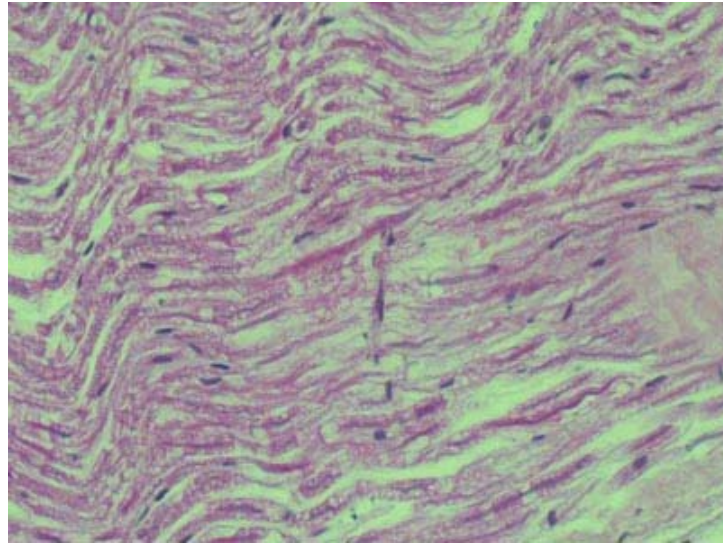
Şekil 4: Sham grubu (Sinir hasarı oluşturulmayan grup) doku kesiti (Hemotoksilen Eozin (HE₄₀))



Şekil 5: Kontrol grubu (sadece crush hasar oluşturuldu) doku kesiti (HE₁₀₀)



Şekil 6: Mannitol crush hasar sonrası 24. saat doku kesiti (HEx100)



Şekil 7: C vitamini Crush hasar sonrası 24. saat doku kesiti (HEx100)

TARTIŞMA

Crush tipi hasar; mekanik iletim bloğu oluşturur ki bu durumda sinirin inerve ettiği kas üzerinde de atrofiye neden olacaktır, öte yandan oluşan iskemi ve iskemi sonrası kanın tekrar o bölgeye göllenmesiyle reperfüzyon oluşur ki bu durumda serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir. İskemik ve mekanik etkilerin toplam etkisi her birinin tek

başına oluşturduğu etkiden daha fazla hasar oluşturmaktadır⁽²⁷⁾.

Deneyde rat kullanılması ana sebepleri öncelikle bilimsel olarak taksonomide memeliler sınıfında olması ve insana genetik ve moleküler açıdan birçok protein benzerliğinin bulunması, vücut olarak küçük olması yani fazla yer kaplamaması böylece rahat müdahale edilebilmesi, bütçe olarak masraflı olmayıp kolay üretilebilen

ve elde edilebilen olması şeklinde sıralanabilir.

Bu çalışmamızda antioksidan özelliğe sahip oldukları gösterilen C vitamini ve mannitolun bir periferik sinir olan siyatik sinir üzerinde nöroprotektif etkilerini göstermeyi amaçladık.

Şenoğlu ve ark sıçan siyatik siniri üzerine crush hasarı sonrası intraperitoneal Alfa Lipoik asid (a-LA) vererek yapmış oldukları çalışmada, antioksidan özelliğe sahip olan a-LA verilen çalışma grublarında, antioksidan mekanizmanın önemli enzimleri olan SOD ve CAT enzim aktivite düzeylerinin arttığı, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinin azaldığını göstermişlerdir. Bu durum a-LA 'din sıçan siyatik siniri üzerindeki oksidatif stresi düşürerek nöroprotektif etki oluşturduğunu göstermektedir⁽²⁹⁾.

Vitamin C (askorbik asit) organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar ve kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Lizinden karnitin sentezinde rol alır. Bu maddenin organizma için önemi; indirgeyici gücünün yüksek olmasındandır; dokularda, dehidroaskorbik aside dönüşerek, molekül başına iki hidrojen atomunu serbest bırakır. Bu ise organizmanın hidroksilasyon reaksiyonlarında, indirgeyici rol oynar. Örneğin kollajen sentezinde, prolinden hidroksi prolin sentezini sağlar⁽¹⁴⁾. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Askorbik asit, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Kuvvetli antioksidan olduğundan, süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijenle reaksiyona girerek, onları etkisiz kılar. Süperoksit radikali (O₂⁻) ve hidroksil radikali (OH•) ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler^(14,26). Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH •) oluşturmaya uygun ferro demire

dönüştürür. Aynı zamanda demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak rol oynar, midede ferri demiri ferro demire indirger^(1,14). Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir^(14,26). Sulu fazda olmasına rağmen, lipid peroksidasyon başlatıcı radikalleri yok ederek membranları oksidan hasarına karşı korur. Bazı çalışmalar, radyasyon hasarında ortaya çıkan serbest radikalleri bağlayarak, koruyucu etki yaptığını göstermiştir⁽¹⁹⁾. Ayrıca, tokoferoksilin α-tokoferole dönüşümünü sağlayarak, endojen E vitamini rejenerasyonunda da rol oynar. Böylece E vitamini ile birlikte, düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'i oksidasyon hasarına karşı korur^(5,26).

Kimyasal olarak, mannitol, bir alkol, şeker veya polioldür. Ama asidik sulu çözeltilerde bir hidrojen iyonunu kaybetme eğilimine sahiptir. Bu sebeple, pH'sını ayarlamak için sodyum bikarbonat gibi bir madde çözeltiliye eklenebilir⁽³¹⁾. Bir şeker alkolü olan mannitol aynı zamanda aktif oksijen türlerinin savurucusu olarak da görev yapabilir. Lipit peroksidasyonu ve hücre hasarını önler⁽¹⁵⁾. Birçok organizmada bulunan şeker alkollerinin (mannitol vb) bakteri, maya, mantar, yüksek bitkiler ve memelileri stresten korudukları gösterilmiştir. Bu etkilerini osmoprotektan olarak görev yaptıkları su benzeri OH grupları ile makromoleküller etrafında yapay hidrasyon küresi oluşturmaları ve düşük osmotik potansiyel koşullar altında metabolik inaktivasyonu önledikleri içindir⁽¹⁵⁾.

Mannitol çoğunlukla hücre içine ve dışına suyun hareketini sağlayan bir osmolit olarak kullanılsa da Hohle ve ark. tarafından yapılan denemelerde simplastik yolla hücre içine girmediği ve metabolizmaya katıldığını

göstermişlerdir⁽¹³⁾. Ayrıca Steinitz ve ark. tarafında yapılan invitro çalışmalarda şeker alkollerinin bir metabolit olarak görev yapabileceği, kimyasal sinyaller yoluyla moleküler fizyolojik süreçleri değiştirebilecekleri, bazı durumlarda da kimyasal ve osmotik strese karşı enzimleri ve diğer molekülleri koruyabilecekleri gösterilmiştir⁽²⁵⁾.

Pharr ve ark. bitkiler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bitkilerin düşük su potansiyeline maruz kaldıkları zaman mannitol birikimini arttırdıkları ve bu mannitol birikiminin stresin inhibisyonuna sebep olduğunu göstermişlerdir⁽²⁸⁾.

Buxton ve ark. mannitolün prolinden dört kat daha yüksek oranda OH radikaliyle reaksiyona girdiğini göstermişlerdir. Stres esnasında radikal üretimi artar ve bunun sonucu poliollerin birikimi proteinlerin oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini sağlamlaştırır⁽⁷⁾. Mannitolün antioksidan etkiyi solut hipotezine uygun olarak, oksijen radikalleriyle difüzyon bağ kurduğu düşünülse, serbest radikalleri temizleme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Li ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 10mm' küçük hava kirletici partiküllerin serbest hidroksil radikalleri ürettiği ve süperkoil DNA'yı etkilediği, mannitolün hidroksil radikalini temizleyerek antioksidan etkili olduğunu göstermiştir⁽¹⁶⁾.

Dokularda yaralanma sonrası ortamda meydana gelen enflamatuvar reaksiyonlara bağlı olarak, çok miktarda superoksit anyonlarının ortaya çıktığı ve bu anyonların özellikle mitokondriyonlar başta olmak üzere, hücresel yapılar üzerinde dejeneratif etkilere neden oldukları rapor edilmiştir. Superoksit dismutaz, doğal antioksidan savunma sisteminde yer alan ve superoksit anyonların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan enzimlerden birisidir⁽¹⁾. Çalışmamızda siyatik sinir yaralanması sonrası SOD aktivitesinin, kontrol grubunda belirgin olarak azaldığı, mannitol ve C vitamini gibi tedavi grubunda SOD

aktivitesinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekmektedir. Sinir yaralanması sonucunda ortamda meydana gelen enflamatuvar reaksiyonlara bağlı olarak superoksit anyonların artış göstermesi, buna bağlı olarak membranların zarar görmesi sonucu SOD aktivitesinin azalması, serbest oksijen radikallerinin oksidatif hasarlarını arttıracaktır. Nitekim mannitol ve C vitamini gruplarında, SOD aktivitesinin deney kontrol grubuna göre artış göstermesi, mannitol ve C vitamininin antioksidan etkisinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

CAT aerobik hücrelerin çoğunda bulunmakta ve bir serbest radikal olan hidrojen peroksidi oksijene ve suya parçalamaktır. Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ve metil etil hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük molekülü lipid hidroperoksitlerini ise etkilemez^(1,3). Çalışmamızda siyatik sinir yaralanması sonrası CAT aktivitesinin, kontrol grubunda belirgin olarak azaldığı, mannitol ve C vitamini gibi tedavi grubunda CAT aktivitesinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekmektedir. Nitekim mannitol ve C vitamini gruplarında, SOD aktivitesinin deney kontrol grubuna göre artış göstermesi, mannitol ve C vitamininin antioksidan etkisinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Lipid peroksidasyonu kimyasal bir olaydır ve serbest radikaller tarafından başlatılır. Zarların lipid yapısındaki değişiklikler nedeniyle fonksiyonların bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir. Lipid peroksidasyonu çok toksik bir zincir reaksiyonudur. Kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonu olması nedeniyle önemlidir. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitlere diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Dolayısıyla doku hasarına ve pekçok hastalığa sebep

olur^(1,22). Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki eski alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayabilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, MDA oluşturur^(30,32). MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik veya kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesine bağlı bir ilişki gösterir^(1,9). Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar^(1,9,17).

Hücre olumsuz şartlara adaptasyon eğilimindedir ki bu süreç içinde ani bir oksijen artışı hücre içi bir çok sistemde oksidasyonu artıracığından oluşan ürünler ve substratlar arasındaki düzensiz korelasyon radikal üretimini tetikleyecek, oluşan radikaller ise ilk hedef olarak lipidlere saldıracaktır. Böylece lipid peroksidasyonu artacaktır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biride MDA'dır^(3,17,24). Sinir sistemi ise lipitten oldukça zengindir. Sfingomyelin lipidler içeren sinirler işte bu ezilme tipi sinir hasarında iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kaldığı için esas olarak hasara uğramaktadırlar^(12,17). Bizde bu çalışmamızda bu hasarı göstermek ve kullandığımız maddelerin hasara karşı koruyucu etkisini araştırmak için siyatik sinir dokusunda MDA düzeylerini çalıştık. Mannitol ve C vitamini verilen bütün ilaç gruplarında (grup 3, grup 4, grup 5, grup 6) kontrol grubuna göre MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olacak şekilde azalması ve sinir liflerinin yapılarının nisbeten korunmuş olması bu görüşümüzü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak C vitamini veya mannitol kullanımının periferik sinirlerde hasar sonrası oluşan oksidatif stresi önleyerek erken ve geç dönemde nöroprotektif etkiler gösterdiği, mannitolün geç dönem nöroprotektif etkisinin daha fazla olabileceği gösterildi. Fakat geniş kapsamlı, daha farklı doz ve sürelerde çalışılmasının daha verimli olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

- 1- Grup 3 ve grup 5'te, SOD ve CAT aktivitesi bakımından kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$).
- 2- Mannitol çalışma gruplarında SOD ve CAT aktivitesi düzeylerinin kontrol grubuna göre erken ve geç dönemde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
- 3- C vitamini grubunda Grup 4 ve grup 6'da MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
- 4- Sonuçta C vitamini veya mannitol kullanımının periferik sinirlerde hasar sonrası oluşan oksidatif stresi önlemede erken ve geç dönemde yararlı olduğu, mannitolün geç dönem nöroprotektif etkisinin daha fazla olabileceği tesbit edildi. Fakat bununla beraber daha geniş kapsamlı, daha farklı doz ve sürelerde çalışılmasının daha verimli olabileceği kanaatine varıldı.

İletişim:

Mehmet Şenoğlu

E-mail: mehmetsenoglu@hotmail.com

Gönderilme Tarihi: 24 Kasım 2011

Revizyon Tarihi: 13 Aralık 2011

Kabul Tarihi: 14 Aralık 2011

The Online Journal of Neurological Sciences (Turkish) 1984-2011

This e-journal is run by Ege University
Faculty of Medicine,
Dept. of Neurological Surgery, Bornova,
Izmir-35100TR
as part of the Ege Neurological Surgery
World Wide Web service.
Comments and feedback:
E-mail: editor@jns.dergisi.org
URL: <http://www.jns.dergisi.org>
Journal of Neurological Sciences (Turkish)
Abbr: J. Neurol. Sci.[Turk]
ISSNe 1302-1664

KAYNAKLAR

1. Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, Konya, Türkiye, 1998; 32-38.
2. Al-Bishri A, Dahlin L, Sunzel B and Rosenquist J: Systemic betamethasone accelerates functional recovery after a crush injury to rat sciatic nerve. *J Oral Maxillofac Surg*, 2005;63(7):973-977.
3. Baykal Y, Kocabalkan F: Serbest radikalleri ve hücre hasarı. *Sendrom*, 2000;9:31-36.
4. Beutler E: Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Stratton Inc. New York, 1984;2:1-5.
5. Bhatia AL, Jain M: *Amaranthus paniculatus* (Linn.) improves learning after radiation stress, *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;85:73-79.
6. Burnett MG, Zager EL: Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*, 2004;16(5):1-7.
7. Buxton G, Greenstock C, Helman W, Ross A: Critical review of data constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solutions: *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1988;17:513-886.
8. Chandra Jagetia G, Rajanikant GK, Rao SK, Shrinath Baliga M: Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin Chim Acta* 2003;332:111-121.
9. Dündar Y, Aslan R: Hekimlikte oksidatif stress ve antioksidanlar. *Uyum Ajans, Ankara*, 2000;4-11.
10. Fridovich I: Superoxide dismutase. *Adv Enzymol*, 1974;41: 56-59.
11. Galinski EA., *Compatible solutes of halophilic eubacteri*, *Experinte*, 1993;49: 487-496.
12. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lance*, 1994;721-724.
13. Hohl M, Schopfer P: Water Relations of Growing Maize Coleoptiles\ Comparison between Mannitol and Polyethylene Glycol 6000 as External Osmotica for Adjusting Turgor Pressure. *Plant Physiol*, 1991;95:716-722.
14. Jagetia GC: Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gradiation. *Clinica Chimica Acta*, 2003;332:111-121.
15. Johan M, Stop H, Mason D: Mannitol Metabolism in Celery Stressed by Excess Macronutrients. *Plant Physiol*, 1994;106:503-511.
16. Lee DH, Kim YS, Lee CB: The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiology*, 2001;158(6): 737-745.
17. Lundborg G, Dahlin LB: Anatomy, function, and pathophysiology of peripheral nerves and nerve compression. *Hand Clin*, 1996;12(2):185-193.
18. Melcangi RC, Cavarretta IT, Ballabio M, Leonelli E, Scheone A, Azcoitia I, Magnaghi V: Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Research*, 2005;48(2):328-338.
19. Nam SY, Cho CK, Kim SG: Molecular and Cellular Pharmacology, Correlation of increased mortality with the suppression of radiation-inducible microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase gene expression by dexamethasone: effects on vitamin C and E-induced radioprotection. *Biochemical Pharmacology*, 1998;56(10):1295-1304.
20. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
21. Pagnotta A, Tos P, Fornaro M, Gigante A, Geuna S, Battiston B: Neurotrophins and their receptors in early axonal regeneration along muscle-vein-combined grafts. *Microsurgery*, 2002;22:300-303.
22. Przerwa A, Zimecki M: Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Med Microbiol Immunol*, 2006;195:143-150.
23. Robinson LR: Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & Nerve*, 2000;23:863-873.
24. Schmelzer JD, Zochodne DW, Low PA: Ischemic and reperfusion injury of rat peripheral nerve. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86(5):1639-1642.
25. Steinitz B: Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J. Plant Physiology*, 1999;155:1-8.
26. Stoll G, Jander S, Myers RR: Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripheral Nervous System*, 2002;7:13-27.
27. Stoll G, Müller HW: Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology*, 1999;9:313-325.
28. Stoop JM, Williamson JD, Pharr DM: Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, 1996;1(5):139-144.
29. Şenoğlu M, Nacitarhan V, Kurutaş EB, Şenoğlu N: Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury*, 2009;25:4-22.
30. Ween Y, Killalea S, Mc Gettigan P, Feely J: Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients. *Lipid peroxidation and Hypertension*, 1996;165(3):210-212.

31. Yang TH, Ho WY: *Effects of Combination Treatment with Dexamethasone and Mannitol on Neuronal Damage and Survival in Experimental Heat Stroke. Biol. Pharm. Bull*, 2010;33(9):1522-1528.
32. Yavaş ID, Zengin M, Kaklıkaya İ: *Serbest Oksijen Radikal Temizleyici Olarak Aprotinin'in Rolü (DeneySEL Çalışma) , Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 1994;3(2):208-215.