

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

STANDART VE İMMÜNÖNÜTRİSYONUN
TRAVMATİK BEYİN HASARINDA APOPTOZİSE ETKİSİ

(UZMANLIK TEZİ)
Dr. NERİMAN ZEYNEP EKİCİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. MELEK SAKARYA

MANİSA
2006

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	3
1. GİRİŞ	4
2. GENEL BİLGİLER	5
3.GEREÇ ve YÖNTEM	25
4.BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	36
6.SONUÇ	40
7. ÖZET	41
8. SUMMARY	43
9.KAYNAKLAR	45

KISALTMALAR

BT:	Beyin tomografisi
CAMP:	Siklik adenzin monofosfat
cNOS:	Yapısal (constitutive) NOS
ÇDYA:	Çoklu doymamış yağ asidi
EPA:	Eikosapentaenoik asid
EDRF:	Endotel kaynaklı vazodilatör faktör
EEN:	Erken enteral nutrisyon
eNOS:	Endotelyal NOS
FBG:	Fosfat bağımlı glutaminaz
GIS:	Gastrointestinal sistem
GKS:	Glaskow koma skoru
GSH:	İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSSG:	Oksitlenmiş glutatyon
İKB:	İntrakraniyal basınç
iNOS:	Uyarılabilir (İndüklenebilir) NOS
LPO:	Lipid peroksidasyonu
LTB4:	Lökotrien B4
MDA:	Malondialdehit
MOY:	Multipl organ yetmezliği
NADPH:	Nikotin adenin difosfat
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NBT:	Nitroblue tetrazolium
NMDA:	N-metil-D-aspartat
PAF:	Platelet agreve edici faktör
PEEP:	Pozitif ekspirasyon sonu basıncı
PGE2:	Prostoglandin E2
slgA:	Sekretuar immünglobulinin A
SOD:	Süperoksit dismutaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
TPN:	Total parenteral nütisyon

1.GİRİŞ

Travmatik beyin hasarı, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenidir. Travmatik beyin hasarına bağlı ölüm oranı yılda 100.000 kişide 14-30 arasında değişmektedir. En fazla risk taşıyan grup 15-24 yaş arası genç kişilerdir; erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha sık görülmektedir (1,2).

Kafa travmalarında mekanik etkinin neden olduğu primer doku hasarı geri döndürülemediği için tedavi çabaları, travmadan sonraki saatler veya günlerde ortaya çıkan biyokimyasal veya fizyolojik olayların neden olduğu sekonder beyin hasarını önlemeye veya ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır (3,4). Sekonder hasarı oluşturan faktörleri önlemeyi hedefleyen tedavilerin hasar sürecini ve sonucunu sınırlandırabileceği düşünülmektedir (5).

Kafa travmalı hastalarda enerji gereksinimini karşılayabilecek, immünolojik durumu düzeltmede, yara iyileşmesinde ve daha iyi nörolojik sonuca ulaşmada yardımcı olacak yeterlilikte bir nütrisyon desteğinin uygulanması gereklidir (6).

İmmün açıdan zenginleştirilmiş içerikli enteral beslenme ürünlerinin kullanımı gittikçe daha çok ilgi çeken bir konudur. İmmün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesini içeren bu yaklaşım immünonütrisyon olarak bilinir ve bu amaçla günümüzde bir çok ürün klinikte kullanılmaktadır. İmmünonütrisyon; inflamasyon, enfeksiyon veya hasara karşı biyolojik yanıtı esas olarak düzenlediği bilinen özel besin ögesi ilave edilmiş ürünlerle uygulanan nütrisyonudur. Glutamin sistemik dolaşıma iskelet kasından sentez edilip salınır; intrasellüler glutamat organlar arası nitrojen ve karbon taşıyıcısı olarak rol alır. Önemli bir enerji kaynağıdır, protein sentezi ve hücrel koruyucu sistemler için gereklidir. Major antioksidan glutatyon sentezi için prekürsördür (7). Yarı esansiyel bir aminoasid olan arjininin immünmodülatör olarak büyük bir potansiyeli olduğu bilinmektedir (8). İmmünonütrisyonun diğer alanlarda yararlı etkileri gösterilmesine karşın serebral hasarlanmadaki etkileri üzerine bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, standart ve immünonütrient ilave edilmiş ürünlerle uygulanan enteral nütrisyonun kafa travmalarında sekonder beyin hasarı üzerine etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kafa Travmaları

Travma, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Travma, çocuklarda ve 45 yaşın altındaki bireylerde önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir.

Kafa travmaları; saçlı deri, kranyum ve kranyum içi tüm yapıların, çarpan, ezen veya penetre eden çeşitli dış fiziksel güçlerin etkisi ile yırtılması, kırılması, ani hareketlenmesi ve bunların sonucu gelişen çeşitli fizyopatolojik olayların tümünün genel adıdır (7).

Travmaya bağlı ölümlerin yarısından çoğunda kafa travması mevcuttur (8). Trafik kazasında ölen olguların yaklaşık %75'inde beyin hasarına ait bulgular saptanmıştır (9). Ağır kafa travmalarına bağlı ölüm oranı %35'tir (10). Ayrıca kafa travmaları nedeniyle tıbbi bakım, rehabilitasyon maliyeti ve işgücü kaybı oldukça büyük boyutlara ulaşmaktadır. Ağır kafa travması geçirmiş hastaların ancak %40-50'si tamamen iyileşebilmektedir (11,12). Bu nedenle travmaya bağlı hasarı azaltmaya yönelik çalışmalarda prognoz ve ölüm oranı üzerine etki eden faktörleri incelemek ve değerlendirmek büyük önem taşımaktadır.

Morfolojik olarak kafa travması fokal ve diffüz olarak sınıflanabilir (13);

- Fokal hasar; intraserebral kanama, subdural hematoma veya epidural hematomu içerir.
- Diffüz hasarda ise; diffüz aksonal hasarın klinik ve radyolojik görünümü yer alır.

Diffüz aksonal hasar korpus kallozumun veya orta beynin dorsolateral kısmındaki fokal lezyonları ve aksonlarda mikroskopik hasarı içerir.

Fokal hasarlarda cerrahi girişim yapılabileceğinden fokal ve diffüz hasar arasındaki ayırımın yapılabilmesi önemlidir.

Son 20 yıldır primer ve sekonder beyin hasarı kavramları gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Primer beyin hasarı travma anında oluşan hasarı belirtir ve beyin kontüzyonu veya lacerasyonunu, diffüz aksonal hasarı, epidural kanama ve subdural kanamayı içerir. Sekonder beyin hasarı, beyni etkileyen ilk travmadan

sonra gelişen ve hastanın prognozunu etkileyen olaylardan kaynaklanır (14). Serebral perfüzyonu azaltan hipoperfüzyon, beyin ödemi, sonradan gelişen hematoma, kafa içi basınç artışı, hipertermi, nöbet, hiperglisemi, enfeksiyon ve iyatrojenik işlemler sekonder etkilerde görülebilir. Dikkatli bir bakı ile bu etkiler zayıflatılabilir veya engellenebilir.

2.1.1. Primer Beyin Hasarı

Hasar anında oluşan olayların engellenebilme olasılığı olsa da geri döndürülemez. Beyin kontüzyonları ve kanamaları hemen tanı alındığında önlenemez iş görememe ve ölüm nedenlerindedir. İntrakraniyal kanamalar yerine göre; intraserebral, subdural ve epidural olarak 3'e ayrılır. Bu kanamaların kombinasyonları da olabilir, ancak nadirdir.

Epidural hematomlar; temporal fossada lentiküler kanama oluşumuyla beraber görülen orta meningeal arterin laserasyonu ile ilişkilidir. Kafatası fraktürü veya venöz sinüse travma diğer epidural kanama nedenlerindedir. Epidural hematomlar klinik olarak lüsid intervale karakterizedir. Hasta başlangıçta uyanıkken hızla büyüyen epidural kitle nedeniyle komaya girebilir. Epidural hematomun hızlı boşaltılması sadece hayat kurtarmaz aynı zamanda derlenmenin hızlı olmasını sağlar. Epidural hematomlu hastalar hematomun boşaltılmasından sonra hızlı iyileşme gösterirler çünkü genellikle altta yatan beyin dokusu normaldir. *Akut subdural hematomlar;* epidural hematomlardan daha sık görülür ve daha kötü prognoz gösterir. Subdural alandaki kanama, sıklıkla kortikal yüzeyden dural sinüslere kanı götüren köprü venlerin hasarından veya beyin yüzeyindeki laserasyonlardan kaynaklanır. Hematomun hızlı boşaltılması bu lezyonlarda görülen yüksek mortalitenin azalmasına yardımcı olabilir.

Kontüzyonlar veya intraserebral hematomlar; travmatik beyin hasarından sonra siktir, daha çok frontal ve temporal loblarda görülür. Genellikle subdural hematomla bir aradadırlar ve zamanla gelişirler. Bu nedenle hastaların takibinde ilk beyin tomografisinden (BT) 4-8 saat sonra kontrol BT çekilmesi önemlidir (15).

2.1.2. Sekonder Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarından sonra ortaya çıkan iskemik/hipoksik durum, sekonder 'otodestruktif' hasara neden olarak nöronal ölümle sonuçlanan patofizyolojik bir döngüyü harekete geçirir. Sekonder hasarın ilk aşamasında

anaerobik glikoliz sonucu biriken laktik asit sonucu membran geçirgenliğinin artmasıyla ödem oluşur (9,15). İkinci aşamada eksitatör nörotransmitterler salınır ve voltaj bağımlı Na⁺ ve Ca⁺⁺ kanalları aktive olur. Kalsiyum lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipaz gibi hücre içinde serbest yağ asitleri ve serbest radikalleri artıran enzimleri aktive eder. Ek olarak translokaz ve endonükleazın aktivasyonu nükleozomal DNA ve biyolojik membranlarda yapısal değişikliğe neden olur. Bu olaylar damar ve hücre yapılarının membranlarında dejenerasyon ve bunu izleyen programlı hücre ölümü (apoptozis) ile sonuçlanır (16,17). Birçok çalışmada, akut travmatik beyin ve spinal kord hasarında serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun doku hasarının nedeni olduğu bildirilmiştir (18,19,20).

Sekonder beyin hasarı sonucu görülen beyin ödemi ve intrakraniyal hipertansiyon önlenemez ise hem serebral perfüzyon azalır hem de gerek beyin dokusunun lokal kompresyonu gerekse kompartmanların yer değiştirmesi sonucu mekanik hasar meydana gelir. Sekonder hasarı oluşturan faktörleri hedefleyen tedavilerin hasar sürecini ve sonucunu sınırlandırabileceği düşünülmektedir (5).

Makroskopik seviyede; sekonder hasarda ödem, iskemi, nekroz, intrakraniyal basınç (İKB) artışı ve yetersiz serebral perfüzyon görülebilir. Hücresel seviyede; hücre ölümüne neden olan vasküler disfonksiyonla beraber hücresel membranların ve yapıların yıkılması, serbest radikal oluşumu, eksitatuar amino asitlerin salınımı ve intraselüler kalsiyumun artması görülebilir (15).

Özet olarak travma ile;

- 1- Hücre duvarı polarize olur,
- 2- Membran fosfolipidleri bozulur,
- 3- Sodyum ve kalsiyum hücre içine, potasyum ise hücre dışına yer değiştirir,
- 4- Kalsiyum hücre zarında fosfolipaz A2 ve C'yi aktive edip, araşidonik asit sentezini arttırır,
- 5- Hücre zarı yapısı bozulur, serbest yağ asitleri artar,
- 6- Eikosanoidler ve SOR sentezi ile platelet agreve edici faktör (PAF) yapımı artarak, diğer hücrelerde de lipid peroksidasyonu artar ve endotel harabiyeti başlar.

Eksituar Aminoasitler

Sekonder hasarı ilk başlatıcı olayın, eksituar aminoasid salınımı olduğuna inanılır. Glutamat en fazla çalışılmış eksituar amino asittir ve hasar mekanizması eksitotoksik etkidir. Kafa travmasını takiben, hasar gören hücreden eksituar aminoasitler salınır. Glutamat 5 reseptör subtipinde postsinaptik olarak etki eder (21). N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör kompleksi, kalsiyum ve sodyum iyonlarının geçişini sağlayan iyon kanalıdır. Glutamatla aktive olduğunda, NMDA reseptörü kalsiyum iyonunun hücreye girmesine izin verir. Nöronlara kalsiyum iyonunun girişiyle proteaz, kinaz, fosfolipaz ve nitrik oksit sentaz aktivasyonu ile kalsiyuma bağımlı enzimler uyarılır. Kontrol altına alınmadığında, bu olaylar hücre iskeletinin yıkılması, serbest radikal oluşumu, membran disfonksiyonu, gen ekspresyonunda ve protein sentezinde bozulma sonucu hücre ölümüne neden olur.

Serbest Radikaller

Serbest radikal oluşumu hasarın birçok mekanizmasında ilk etkidir (17, 22). En fazla çalışılan serbest radikaller süperoksid (O_2^-), hidroksil (OH^-) ve nitrik oksittir. Serbest radikaller kendilerini aktif hale getiren, dış yörüngelerinde çiftleşmemiş elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Serbest demir serbest radikale bağlı hasarda önemli bir katalizördür, hasarlı veya kontüze dokuda hemen yer alır. Serbest radikaller endotelial hücrelere etki eder ve beyin dokusuna zarar verir. Böylece kan-beyin bariyeri bozulur ve vazojenik ve sitotoksik ödeme neden olur. Serbest radikale bağlı hasar başladığında daha fazla serbest radikal yapımına neden olarak kendi kendine ilerler. Vitamin E, askorbik asit, süperoksid dismutaz serbest radikallere bağlanarak hasarı sınırlamaya çalışır. Serbest radikalleri tutan farmakolojik ajanlar kafa travmasının hayvan modellerinde nöronal hasarı azaltmada etkili olmuştur (22).

Biyolojik sistemlerde oksidatif stres; oksidanlar ve anti-oksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır ve organizmada pek çok patolojik durumla ilişkilidir. Metabolik stres, doku hasarı ve hücre ölümü sonucu serbest radikal oluşumu artar ve bu durum da oksidatif stresi artırır (23).

Serbest radikallerin bilinen zararlı etkileri:

1. Proteinlerin zarar görmesi,
2. Enzimlerin inaktivasyonu,

3. Hücre yüzeyindeki reseptörlerdeki değişiklik,
4. Na-K-ATPaz, Ca-ATPaz gibi hücre iyon transport proteinlerinin yıkılması,
5. DNA'nın zarar görmesi (malign transformasyona neden olur)
6. Bağ dokusu harabiyeti,
7. Lipid peroksidasyonu (LPO) şeklinde sıralanabilir (23,24,25).

Organizma, kendisini serbest radikaller aracılığıyla ortaya çıkaran bu klinik tablolardan biyokimyasal savunmanın gelişmesiyle korumaya çalışmaktadır.

Savunma serbest radikal temizleyiciler ve kompleks enzim sistemleri aracılığıyla gerçekleşir (26,27,28).

Savunma mekanizmaları 3 grupta incelenir (26,28,29,30):

1. Oluşumlarını önleme aşamasında;

- Allopürinol,
- Dimetil sülfoksit,
- Glukokortikoidler,
- Sodyum salisilat, indometazin,
- Mannitol ve furosemid

2. Serbest radikal zincirini bozma aşamasında;

- Vitamin E, C, A,
- Transferin ve seruloplazmin,
- Demir bağlayan diğer proteinler,
- Metal ve metal bağlayan proteinler,
- Ürik asit,
- Glutasyon,
- B-karoten

3. Zararsız duruma getirme aşamasında;

- Süperoksit dismutaz (SOD),
- Katalaz (CAT),
- Glutasyon peroksidaz (GSHPx)

Belirtilen savunma mekanizmasının elemanları, tek tek veya bir arada radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar zincirini etkileyip zararsız hale getirmeye çalışmaktadır (29,31).

Serbest radikaller hemen hemen bütün biyokimyasal maddelerle (aminoasit, nükleik asit, organik asit, şeker, fosfolipid) kolaylıkla reaksiyona girerler. Bu

reaksiyonlar da diğ er organik maddelerin oluşmasına neden olur. Reaksiyonlar içinde en önemlisi; hidroksil radikalinin membran fosfolipidleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatmasıdır. Serbest radikaller LPO'nu başlatan temel maddelerdir (32).

Kafa travmalarına bağı lı hasar sonrasında SOR, endotel hücre hasarına bağı lı olarak kan beyin bariyerini bozar veya direkt etki ile beyin ödemine veya nöronlarda yapısal değ iş ikliklere neden olurlar (33). Beynin ve spinal kordun travmatik nöronal hasarları primer ve sekonder mekanizmalar ile doku zedelenmesine ve fonksiyon kaybına neden olur.

Beyin ve sinir sistemi, SOR'nin neden oldu ğ u doku hasarına birçok faktörün etkisi ile daha yatkındır (34). Membran lipidleri SOR ile kolayca reaksiyona giren kolesterol ve doymamış ya ğ asitlerinden oldukça zengindir. Beynin koruyucu faktörleri olan; SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri oldukça sınırlıdır. Kafa travması sonrasında SOR'nin oluşumunu tetikleyen demir açısından ise beyin oldukça zengindir. Santral sinir sisteminin gri ve beyaz cevherlerinde yüksek oranda askorbik asit bulunur. Tek başına yüksek konsantrasyonda bulundu ğ unda antioksidan olan bu madde, travma ve iskemide kanın ekstrasvazasyonu sonucu açığ a çıkan bakır ve demir iyonları varlığ ında fazla miktarlarda SOR oluşumuna neden olur (35,36). SOR'nin lizozomal membrana etkisi ile lizozomal hidrolitik enzimler nöronun sitoplazmasına salınır.

Akut santral sinir sistemi ve travmatik beyin yaralanmalarında SOR bağı mlı bu lipid peroksidasyonu fizyopatolojinin temelini teşkil eder (37,38). SOR; serebral travmalarda, ödem ve doku iskemisini başlatan en önemli nedenlerdendir (22,39,40,41). Aynı zamanda endotel hücre harabiyetine, kan beyin bariyerinde bozulmaya ve nöron ile glial hücrelerde yapısal değ iş ikliklere yol açar (41).

Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) son yıllarda dikkati çeken birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO vasküler relaksasyon, nörotransmitter etkiler ve sitotoksisite gibi çeşitli hücresele basamakta ikincil haberci olarak yer almaktadır (42,43). Otokrin ve parakrin bir hücresele ajan olan NO, normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. İlk kez 1916 yılında memelilerde NO varlığı

gösterilmiş, 1985'de aktive olmuş makrofajların NO saldığı bulunmuştur. Sonrasında NO sentezi için L-argininin prekürsör olduğu ve NO sentezinin inhibisyonu için L-arginin bazlı hem analoglarının kullanılabileceği gösterilmiştir. Endotel kaynaklı vazodilatör faktörün (EDRF) NO olduğu belirlendikten sonra bu molekülün beyinde, birçok hücre ve organ sistemlerinde üretilerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda etkili olduğu ileri sürülmüştür (44).

Nitrik Oksit Sentazın (NOS) yapısı ve özellikleri:

NO vertebralılarda, sitokrom P-450 redüktazın homoloğu olan NOS yardımıyla L-argininden sentezlenir. Son görüşlere göre NOS uyarıldığında, iki oksijen molekülünün aktivasyonu ile bir çift oksijen atomu, L-arginine girerek NO ve sitrülün üretmektedir (43,45,46).

NOS izoenzimleri: Temel olarak 2 ana grupta incelenir:

A. Yapısal (constitutive) NOS (cNOS): Ayırıcı özelliği, aktivitesinin Ca^{+2} 'a bağımlı olmasıdır. Özellikle damar ve endotel hücreleri (47,48), ürogenital sistem dokuları (49,50), santral ve periferik sinir sistemi nöronları (51,52), adrenal korteks ve medulla hücreleri (53), trombositler (24-26), uterus ve barsak interstisyumunda bulunmaktadır (54,55). cNOS'un iki izoformu mevcuttur: nNOS ve eNOS. cNOS ve izoenzimlerinin başlıca buldukları yerler ve etkileri farklıdır.

nNOS kaynaklı NO: Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tespit edilmiştir.

Merkezi sinir sistemi: Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük ağırlıklı nörotransmitterdir. Presinaptik salgılanan glutamatın etkisiyle postsinaptik uçtaki hücrenin NOS'ı aktive edilir ve oluşan NO ile hedeflenen etkisini oluşturur (51,56). Ayrıca sinapsların şekillenmesinde, koku alma (51), görme (57), ağrıyı algılama (52,56) ve hafıza oluşması (51) gibi işlevlerde rol alır.

Periferik sinir sistemi: Nonadrenerjik ve nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar (51,52). Solunum fonksiyonlarında (58), penis ereksiyonda (59), gastrointestinal sistem motilitesinde (60), mesane sfinkter işlevinde (61) ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol oynar.

2. eNOS kaynaklı NO: Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder (62). Trombositlerin

adhezyonunu ve agregasyonunu inhibe eder (54,55). Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir (63).

B. Uyarılabilir (inducible) NOS (iNOS): İlk olarak endotoksinler ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu izoform aktivite için Ca^{+2} 'a bağımlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. iNOS başta makrofajlar olmak üzere polimorfonükleer lökositler (64), hepatositler (65), damar düz kasları (45,46), damar endoteli (46), astrosit ve kondrositler (66) tarafından üretilir. Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle nonspesifik immünitede önemli rol oynar.

Travma ve Nitrik oksit

cNOS ile üretilen NO normal fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için gereklidir. iNOS ile üretilen yüksek konsantrasyonlar ise hasarı artırır (67). Sepsis ve inflamasyonda iNOS enziminin tetiklenmesi sonucunda NO üretimi artar. Travma durumunda ise ekstrahepatik arginaz ekspresyonu ve aktivasyonu artarken NO sentezi arginaz ve NOS enzimleri arginini substrat olarak kullanırlar. Arginaz ekspresyonu arttığında hücre içinde ornitin ve poliamin konsantrasyonları artarken endotel hücrelerde bazal NO sentezi azalır. Endotelden salınan NOS ile sentezlenen NO, damarların gevşemesi, platelet agregasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek, travma sonrasında organlarda kan akımının sürdürülmesini sağlar (68). Travma modelinde yapılan bir çalışmada sıçanlarda artan ekstrahepatik arginaz ekspresyonu ve aktivitesinin, plazma nitrat-nitrit konsantrasyonlarının kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir (69). Ratlarda laparotomi modelinde yapılan çalışmalarda operasyonu takiben damar içine L-argininin uygulamasının splanknik kan akımını ve kalp atım hızını artırdığı bildirilmiştir (70,71). Benzer bir çalışmada da abdominal laparotomi sırasında bazal düzeyde sentezlenen NO'in akut dönemde mikrovasküler bütünlüğün sağlanması için önemli olduğu gösterilmiştir (72).

Apoptozis

Apoptozis, normal doku veya organ homeostazisinde enerji bağımlı bir işlem olarak ilk kez 1972 yılında tanımlanmıştır (73). Hücre proliferasyonu ile hücre ölümü normal dokularda denge halindedir. Yetişkin dokularında bu denge hali doku hacminin devamlılığını sağlar (74). Hücre ölümü embriyoda organogenez

sırasında ve yetişkinlerde hücre devri ve diferansiyasyonu sırasında fizyolojik olarak gerçekleşirken, çeşitli hasarlanmalara yanıt şeklinde patolojik işlem olarak da gerçekleşir (75).

Apoptozis ve nekroz hücre ölümünün iki tipi olarak belirlenmiştir (76). Son yıllarda hücre biyolojisi ve biyokimyası üzerine yapılan araştırmalarla apoptozisin hücre genomunun kodlandığı proteinlerin eş zamanlı ortaya koydukları mekanizma ile gerçekleştiği saptanmıştır (77). Çeşitli etkenlerle tetiklendiğinde apoptozis, hücrede iyi tanımlanmış morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur (78).

Bunlar arasında:

1. Hücre büzüşmesi,
2. Kromatin yoğunlaşması,
3. Nükleer membran yıkımı,
4. Sitoskletal reorganizasyon, DNA fragmentasyonu ve 'laddering',
5. Plazma membranının 'blebbing'i,
6. Sitoplazmik materyal içeren apoptotik cisimcikler,
7. Hücrede adhezyon kaybı.

Apoptoziste mitokondriyal membran permeabilitesinde artış görülür.

Mitokondri dış membrandan apoptojenik faktörler salar ve iç membranın elektrokimyasal gradientini yok eder (79). Mitokondriyel disfonksiyonun sonuçları (mitokondrinin transmembran potansiyelinin kollapsı, solunum zincirinde bozulma, süperoksid anyonlarının aşırı yapımı, mitokondriyal biyogenezin bozulması, matriks kalsiyum ve glutatyonun dışa akımı, solubl intermembran proteinlerinin salınımı) sitozole kaçan apoptozisi indükleyen faktörler ve sitokrom-c gibi mitokondriyal proteinlerle spesifik apoptojenik proteazların aktivasyonudur (80).

Apoptoziste en önemli değişiklik hücre nükleusunda gerçekleşir; organeller ve membran sağlamdır. Kromatinin kondansasyonu ile birlikte nükleus büzüşür ve bunu nükleer membranın kaybı ve nükleer materyalin rezidüel fragmanlara parçalanması izler. Bu apoptotik cisimler komşu hücreler tarafından içeri alınırlar. Lökositlerin infiltrasyonu ile gelişen inflamatuvar reaksiyon bulunmaz (77). Apoptozis, enerji gerektiren aktif bir olaydır ve hücre nekrozunda görülen sitoplazmik disintegrasyonu izleyen nükleer otolizisten tamamen farklıdır (81).

2.2. Kafa Travmalı Hastada Nütrisyon

Günlük enerji ve protein gereksinimlerini doğal şekilde alamayan tüm hastalarda olduğu gibi kafa travmalı hastalarda da nütrisyon desteği uygulanmalıdır. Kontrendike olmadığı durumda sağladığı pek çok avantaj nedeni ile enteral beslenme tercih edilir.

2.2.1. İmmünonütrisyon

Cerrahi, travma veya enfeksiyon sonucu oluşan sistemik inflamatuvar yanıt hastaların metabolik ihtiyaçlarında artışa ve gerekli besin depolarında azalmaya neden olur. İmmünonütrisyon; bazı besin öğelerini normal diyetteki miktarlarının üzerinde içeren veya özel besin öğesi ilaveli ürünlerle beslenen hastaların immün sisteminin aktivitesinin düzenlenmesi olarak tanımlanabilir (82). İmmün sisteme etkili olan nutrientler; glutamin, arjinin, nükleotid ve omega-3 yağ asitleridir (83).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar immünonütrisyon ile cerrahi sonuçların, infeksiyöz komplikasyon oranının ve hastanede kalma süresinin olumlu yönde değiştirilebileceğini göstermektedir (84).

Gastrointestinal sistem (GIS) sindirim ve absorpsiyon dışında, infeksiyöz ajanlara ve toksinlere karşı bir savunma organı olarak da görev yapar. Bu görev immünolojik ve nonimmünolojik bariyer mekanizmaların bütünlüğüyle sürdürülür. Nonimmünolojik savunma tükrük sekresyonu, mide asiditesi, safra tuzları, peristaltizm ve intestinal mikroflora tarafından oluşturulur. Ayrıca barsak epitel hücreleri ve mukus mekanik bir bariyer yapar (84). İmmünolojik savunma barsakla ilişkili lenf dokusu (gut-associated lymphoid tissue=GALT) tarafından düzenlenir. Vücudun immünolojik kitlesinin ortalama %50'sinin GIS'de yer aldığı ve vücutta üretilen immünglobulinin %80'inin sekretuar immünglobulin A (slgA) olarak barsak mukozasından salgılandığı tahmin edilmektedir (85). slgA'nın önemli bir özelliği kompleman sistemini uyarmasıdır. slgA bakterileri, virüsleri ve toksinleri mün tabakası içinde bağlayarak veya aglutine ederek vücudun epitel yüzeylerini kaplayan bakteriler ile dolaşım sistemi arasında immünolojik savunmayı üstlenir (86). Peyer plakları mukozal immünite için çok önemli bir alandır ve follikül ile dome adı verilen iki bölümü vardır. B hücreleri Peyer plaklarında bulunur ve

antijenik bir hücumda uygun T hücresi ortamı varsa, çoğalacakları mezenter lenf düğümlerine hareket ederler. Buradan torasik kanala salınan hücreler GIS submukozasına dağılır ve lamina propriada IgA üretirler. sIgA barsaktaki antikor cevabından sorumlu major immünglobulindir (84).

Yanık, hemorajik şok, barsak tıkanması, radyasyon ve total parenteral nütrisyon (TPN) desteğinin uzaması gibi durumlarda da barsak mukoza bariyeri yıkılır ve intestinal patojenlerin translokasyonu başlar. Epitel hücre tabakası, doğal flora veya intestinal immün sistemin herhangi birisindeki bozulma mukozal defansın yıkılmasına neden olabilir (87). Birçok deneysel çalışma, barsak mukozasının basit bir yaralanmasında bile bakteriyel translokasyonun olduğunu gösterir (88). GİS mikroflorası değiştiğinde enterik bakteriler mezenterik lenf bezlerine, karaciğere, dalağa ve akciğere transloke olur.

Mukoza bütünlüğünün bozulması, bakteriyel çoğalma ve immün sistem harabiyeti, bakteriyel translokasyona ve sonuçta multipl organ yetmezliğine (MOY) neden olur. Bu nedenle GİS bütünlüğü korunursa, normal bakteriyel floranın devamı sağlanırsa veya immün sistem desteklenirse translokasyon oranı düşürülebilir (87). Lally ve ark., enteral beslenmenin barsak mukozasını stres ülserinden koruduğunu bildirmişlerdir (89).

Günümüzde araştırmacılar, GİS bariyerini güçlendirecek ve daha önemlisi bağışıklık işlevini artıracak besin maddeleri üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. İmmün sistem üzerine farmakolojik etkileri gösterilen en önemli besin öğeleri glutamin, arginin, RNA nükleotidleri ve balık yağı kaynaklı lipidlerdir.

Glutamin

Glutamin, birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeniyle son 10 yılda dikkat çeken bir aminoasittir (90). Glutamin vücutta en fazla bulunan (total aminoasitlerin %20'si) (91,92) ve ince barsak epitel hücrelerinin temel oksidatif enerji kaynağı olan bir aminoasittir (93). Glutamin; nükleik asitlerin, glutatyonun ve diğer aminoasitlerin sentezinde kullanılır (94). Glutamin sentezi normal şartlarda hemen hemen bütün vücut dokularında yeterince yapılabildiğinden esansiyel bir aminoasit değildir. Belirgin patofizyolojik durumlarda dışarıdan glutamin desteği gerekmesinden dolayı glutamin duruma göre esansiyel olabilen bir aminoasittir

(95). Proteinlerin önemli yapı taşıdır ve alfa-ketoglutarat ve glutamik asit yoluyla aminoasit transaminasyonunun santral bir metabolitidir.

Glutaminin organlara özel önemini belirten Krebs, glutamin metabolizmasının ana enzimlerinin farklı dokulara değişik oranlarda dağıldığını bulmuştur (96). Glutaminaz en çok karaciğerde ve glutamin sentetaz ise en çok iskelet kasında bulunmaktadır. Glutamin, iskelet kasından kısmen de akciğerden serbestleşir ve barsağa, kan hücrelerine, karaciğere ve böbreklere gider (97). Kişi tok bile olsa iskelet kası devamlı glutamin üretmekte ve glutamine gereksinimi olan organlara göndermektedir.

Glutamin periferden splanknik bölgeye en önemli amonyum taşıyıcısıdır ve hücre bölünmesi sırasında oksidasyon yakıtı olarak görev alır (98). Uzun süren açlıkta ve katabolik durumlarda glutamin ve daha düşük düzeyde alanin iskelet kasından tüm diğer organlara azot sağlar. Esansiyel aminoasitler bile iskelet kasında glutamine ve alanine dönüşür. Alanin en önemli glukojenik aminoasit iken glutamin klasik beslenme görevlerini yerine getirir, hücre çoğalmasını, apoptozu hatta özel proteinlerin sentezini düzenler. Lenfositlerin çoğalmaları, makrofajların, mRNA, sekretuar proteinlerin, peptid habercilerin ve protein reseptörlerinin sentezini yapabilmeleri için glutamin gereklidir (99).

Glutamin pürin ve pirimidinin ön maddesidir. Bunlar ise lenfositlerin ve makrofajların çabuk aktive olmaları için gereklidir. T lenfositlerin çoğalmaları RNA ile aktive olduktan ve mitojenik antikorları CD3'e yönelttikten sonra büyük ölçüde kültür ortamındaki glutamin konsantrasyonlarına bağlıdır (100). T lenfositlerinin glutamine olan bağımlılıkları hücre yüzeyindeki aktivasyon belirteçlerine (CD25, CD45RO, CD71), interferon gamma ve tümör nekroz faktör-alfa üretilmesine bağlıdır (100). Glutaminin tükenmesi hücrenin G0-G1 fazlarında duraklamasına (101), lenfokinin aktive ettiği öldürücü hücre aktivitesinin azalmasına (102), hücre içindeki glutatyonun (GSH) azalmasına neden olur (103). Ayrıca glutamin, myelomonositik U937 hücrelerinin monositlere olgunlaşması için önemlidir (104). Glutamin konsantrasyonu azalınca DNA sentezi de azalır, hücre sitoplazmasının hücre çekirdeğine oranı ve vakuol oluşumu artar (105).

Glutaminin düzenleyici kapasitesindeki mekanizmanın olası başka bir açıklaması; barsak hücrelerinde gösterilmiş olduğu gibi, hücre dışındaki sinyal düzenleyici ve nükleer kinazları aktive etmesi şeklindedir (106). Bu duruma göre glutamin kinaz yolundaki sinyalleri güçlendirebilmelidir. Diğer bir olasılık ise

glutaminin hücrelerdeki azalan oksijen redoks potansiyelini glutatyon sentezini artırarak etkilemesidir.

Glutamin barsak mukoza hücreleri (107,108), lenfositler ve monositler (109) için birincil metabolik yakıttır. Akciğerler, yağ dokusu ve karaciğer glutamin kaynağıdır, ancak iskelet kasının glutamin depolanması, sentezi ve salınımında major bölge olduğu düşünülür. Hayvan ve insan çalışmalarında, operatif stres veya sepsis durumunda periferden splanknik dokulara net glutamin akışı gösterilmiştir (98,110). Glutamin renal amonyak yapımında da major substrat olduğundan asit-baz dengesinin idame etirilmesinde de gereklidir.

Hastalık durumunda, özellikle travma ve enfeksiyonlarda glutamin ihtiyacı belirgin şekilde artabilir ve kullanımı endojen üretimi aşabilir. Vinnars ve ark. (7) elektif kolesistektomi geçiren hastalara birçok deneysel aminoasit içeren dengeli parenteral solüsyonları verip kan ve hücre içi kas aminoasit konsantrasyonlarını ve nitrojen dengesini değerlendirmişlerdir. Standard aminoasit solüsyonları alanin-glutamin içeren ve glutamin içermeyen izonitrojenik-izokalorik solüsyonlarla karşılaştırılmıştır. Glutamin içeren solüsyonlar glutamin içermeyenlere göre nitrojen dengesini düzeltip, kas protein sentezini korumuş ve iskelet kasından hücre içi glutamin kaybı daha az olmuştur. Bu durum barsak mukozası ve immün hücreleri gibi dokularda artmış glutamin ihtiyacından veya kullanımından kaynaklanabilir.

Enteral formüllerde bütün protein kaynakları glutamin içermesine rağmen, glutamin proteine bağlı olduğundan, tam olarak glutamin içeriğini saptamak zordur çünkü bütün proteinler kendi aminoasit kompozisyonlarını belirlemek için ısı ve aside hidrolize olur. Bu durum glutaminin glutamata hidroliziyle sonuçlanır. Son zamanlarda protein ve peptid bağlı glutamin tayini için yeni yöntemler geliştirilmektedir (111). Enteral ticari ürünlerin çoğu glutamin olarak %14'den az total protein içermektedir (112). Bu doz istenen farmakolojik etkiyi oluşturmak için yetersiz kalmaktadır. Enteral glutaminin toksik metabolit oluşturmadan veya klinik toksisiteye neden olmadan iyi tolere edildiği belirtilmektedir (113). Parenteral yolla glutamin uygulamasının da hem hayvan hem insanlarda yapılan çalışmalarda istenmeyen biyokimyasal etkilere yada toksisiteye neden olmadan güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir (114).

Glutamin, birçok tümör hücresi için de tercih edilen bir yakıt olarak kabul edildiğinden antiproliferatif tedavi almayan kanserli hastalarda kullanımını

sınırlayabilir. Bununla beraber, Klimberg ve ark. (115) yaptığı bir çalışmada; metotreksat uygulanan kanserli rata glutamin verilmesinin morbidite ve mortaliteyi azaltmanın yanı sıra ilacın tümörisidal etkinliğini de artırdığını göstermişlerdir.

Son çalışmalar glutaminden zengin enteral diyetlerin ratlarda in vivo olarak NO biyosentezinin potent inhibitörü olduğunu göstermiştir (116). L-glutamin NO ve süper oksid gibi serbest radikallerin yapımının çok arttığı iskemi/reperfüzyon hasarında da kardiyoprotektif etkiler gösterir (117). Glutamin, tek başına NOS aktivitesini inhibe etmez ama glutamin metabolizmasının endotelial NO sentezinin düzenlenmesindeki düzenleyici etkisine ihtiyaç duyulabilir (118). Sonuç olarak, glutamin endotelial NO sentezinin fizyolojik inhibitörüdür (119). Ayrıca glutaminin glukozamine metabolize olması endotelial NO sentezinin inhibisyonunda gereklidir.

Antioksidan Glutasyon Prekürsörü Glutamat

Glutaminin bir diğer önemli özelliği; beyin nörotransmitteri olan glutamatın da prekürsörü olmasıdır. Glutasyon sistemi oksidatif stresi azaltmada önemli mekanizmalardan biridir (120). Glutamin bu sisteme karaciğerde (121) veya iskelet kasında (122) glutamat kaynağı oluşturur ve hem hepatik hem barsak modellerinde iskemi veya travmadan sonra total glutasyon düzeylerini koruduğu gösterilmiştir (123).

Glutamin glutamat, sistein ve glisin aracılığı ile glutasyon sentezinin öncüsüdür. Glutamin-glutamatın nöron ve glial hücreler arası siklusunda; sinaptik aralığa salınan glutamat glia hücresine alınır, glutaminaz sentetazla glutamine dönüştürülür ve tekrar nörona alınır. Burada fosfat bağımlı glutaminaz, glutamat depolarını tekrar doldurur (124).

Nöral hücreler içinde astrositler oksidatif strese daha dayanıklıdır ve nöronlar için koruyucu rolleri vardır. Bunun nedeni GSH içeriklerinin daha yüksek olmasıdır. SOR' ni temizlemede; GSH oksidize olarak glutasyon-protein disülfidlerini oluşturur böylece glutamat etkisiyle hücrenin GSH'ı sentez veya indirgeme yeteneği, hücrenin oksidatif stres ve nörotoksisiteyle nasıl etkili mücadele edebileceği açısından önemli rol oynar (125).

Beyin özellikle oksidatif hasara duyarlıdır. Yüksek oranda serbest oksijen yapımı, hücre membranında çoklu doymamış yağ asidlerinin bol olması ve oksidatif metabolizmanın yüksek hızına rağmen beyinin göreceli olarak zayıf bir antioksidan savunma sistemi vardır.

SOR'nin zararlı etkilerine karşı glutamat düzeylerini artırması açısından glutamin önemli bir moleküldür. Glutamin glutatyon prekürsörü olduğundan dolayı, diyetle glutamin uygulaması oksidatif stresten kaçınmada ve glutatyon düzeylerini yüksek tutmada kullanılabilir (126).

Son çalışmalar göstermiştir ki; S-nitrozo-glutatyon (GSNO) ve NO radikali in vivo olarak hidroksil radikalının indüklediği oksidatif stresten beyin dopamin nöronlarını korumaktadır (127). GSNO ve NO radikali beyinde oksidan stresi sonlandırmak için:

1. Fenton reaksiyonunu veya demirin indüklediği hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederek,
2. Lipid peroksidasyonunu sonlandırır,
3. GSH'ın antioksidatif etkinliğini artırır,
4. Beyin kökenli nörotrofinin nöroprotektif etkisini düzenler,
5. Sistein proteazları inhibe eder (127).

Arjinin

Arjinin immün fonksiyonu güçlendirme, yara iyileşmesini hızlandırma ve nitrojen retansiyonunu artırmada farmakolojik değeri olan bir aminoasittir. Bu etkilerinin çoğu rat modellerinde gösterilmiştir (128). Diyetteki arjinin desteğinin, laboratuvar çalışmalarında, artmış timik boyut, mitojen ve alloantijenlere karşı artmış lenfosit proliferasyonu, tümör hedef hücrelerinin makrofaj ve natural killer hücrelerle yıkımının kolaylaştırılması, artmış lenfosit interlökin-2 üretimi ve reseptör aktivitesi sağlanması gibi yararlı etkileri mevcuttur (8).

Arjinin üre siklusunda arjinaz enzimi ile üre ve ornitine hidrolize olan yarı esansiyel bir aminoasittir. Ornitine dönüşümü, hücre sel büyüme ve farklılaşmada anahtar molekül olan poliaminlerin yapımındaki rolünü açıklamaktadır (129).

Arjininin günümüzde immünmodülasyonda oynadığı rolden dolayı kritik hastalardaki önemi dikkat çekmektedir (8). Deneysel hayvan ve insan çalışmalarında arjinin takviyesinin hücre sel cevabı ve travmanın neden olduğu T hücrelerin fonksiyonlarını düzelttiği ve fagositozu hızlandırdığı görülmüştür (130). Daly ve ark. (131) yaptığı randomize, prospektif bir çalışmada major cerrahi işleme alınan 30 kanser hastasının enteral beslenmelerinde arjininin etkilerini incelemişlerdir. Arjinin alan hastalarda timik ağırlık ve lenfosit içeriğinin arttığı, mitojen uyarıya timik lenfosit yanıtın düzeldiği ve işlem sonrasında timik değişimin

yavaşladığı görülmüştür (131). Arjininin ayrıca CD4 lenfosit (T4 hücre) konsantrasyonunu ve lenfosit blastogenezi artırdığı saptanmıştır.

Arjinin glukagon, prolaktin, insülin ve büyüme hormonu gibi birçok hormonun salınımını uyarır. Total aminoasit yüküne ilave olarak renal yetmezliği olan hastalarda arjinin azotemiye katkıda bulunabilir. L-arjinin NO yapımında gerekli olduğundan, vasküler tonüsü etkileyebileceği belirtilmesine rağmen, enteral veya parenteral arjinin uygulanan hastalarda kan basıncında yada hemodinamik stabilitede herhangi bir ters etkisi görülmemiştir. Arjinin verildiğinde serum IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü) artışının görülmesi arjininin büyüme hormonunun salınmasını etkilediğini göstermektedir. Büyüme hormonu, IGF-1 ve prolaktinin insanlarda yararlı anabolik etkilere ve immün yanıtlara neden olduğu düşünülmektedir (132). Ayrıca bu etkisi nedeniyle, hipotalamik-hipofizer aksdaki özel mekanizması yara iyileşmesinde de önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (133). Alexander ve Gottschlich (134) yanık hastalarında standart enteral beslenme ile arjininle zenginleştirilmiş özel beslenmeyi karşılaştıran randomize bir çalışma yapmışlardır. Arjinin alan grupta yara enfeksiyonu ve mortalite oranı daha düşük, hastanede kalma süreleri de daha kısa bulunmuştur (134). Arjinin ayrıca kollajenin ana komponentleri olan prolin ve hidroksprolinin prekürsörüdür (135).

Nükleotid

Nükleotidler hemen hemen bütün biyokimyasal işlemlerde önemli rolü olan düşük moleküler ağırlıklı biyolojik bileşiklerdir (136). Son zamanlarda enfeksiyonlarla nükleotidler arasındaki ilişkiye dikkat çekilmektedir (137).

Nükleotidler;

1. DNA ve RNA yapımında yer alan pürin ve pirimidinleri içerirler,
2. Hücresel enerji yollarında gereklidirler (adenozin trifosfatın -ATP- yapısında),
3. Fizyolojik düzenleyici (siklik adenozin monofosfat –cAMP) olarak önemli rolleri vardır,
4. Birçok diğer fonksiyonlarının yanı sıra glikojen ve glikoproteinlerin sentezinde yer alan birçok koenzimin yapısında yer alırlar (136).

Nükleotidler hücrenin hemen her yerinde olmalarına rağmen, yetişkin bir insanın normal diyetiyle günde yaklaşık 1-2 g alınabilirler (138). Nükleotidlerin

endojen kaynağı “de novo” senteziyle sağlanır ve önceden oluşturulmuş bazların salvaj yoluyla, istenen bileşimlere çevrilmesiyle oluşturulur (139). Pürin ve pirimidin sentezinin esas kaynağı aminoasitlerdir. Kritik hastalıklarda ise nükleotidler yeterli miktarda oluşturulamazlar.

Nükleotidler protein sentezini artırır ve bazı T hücre aracılı immün cevapların düzenlenmesine katılırlar (140). Hayvanlarda diyetle alınan nükleotidlerin hücrel ve humoral immüniteyi idame ettirmede ve intestinal gelişimi desteklemede önemli olduğu görülmüştür (141). Nükleotid içeren diyetler barsak florasını bifidobakteri lehine değiştirebilir (142).

Normal koşullar altında, insan vücudunda yeterli miktarda nükleotid çoğunlukla karaciğerde, folik asit, glutamin ve diğer aminoasitleri gereksinim gösteren seri reaksiyonlarla oluşturulur. İntestinal mukoza ve lenfoid dokular gibi hızlı bölünen dokularda, ekzojen nükleotidler nükleozid ve bazlara önemli kaynak olabilirler.

Enteral yoldan alınan nükleotidler intestinal enzimlerle sindirilir ve nükleozid veya serbest baz ve monosakkarid olarak emilir (143). İnsanlarda enteral nükleotidlerin etkileriyle ilgili veriler çok sınırlıdır. Balık yağı, antioksidan, arjinin ve nükleotidlerle zenginleştirilmiş beslenme ürünleriyle yapılan olumlu çalışmalar olmasına rağmen sadece tek eklenen değişkenin nükleotid olduğu beslenme ürünüyle ilgili klinik çalışmalarla ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (144).

Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

Enteral veya parenteral nütrisyonunda kullanım için son zamanlarda alternatif lipid kaynaklarıyla ilgili heyecan verici gelişmeler sağlanmıştır. Nütrisyon desteğinde lipid kullanımının temeli yoğun kalori ve esansiyel yağ asidi linoleik ve linolenik asidi sağlamaya yöneliktir. Lipidlerin biyokimyasal, yapısal ve düzenleyici önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Yoğun kalori desteği veren nütrisyon elemanı olmalarının yanı sıra altta yatan hastalığa göre farklı lipid kaynaklarının kullanılması gerektiği bilinmektedir (145).

Yağ asitleri karbon zincir uzunluğuna, çift bağın sayısına ve pozisyonuna göre adlandırılır. Çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) iki veya daha fazla çift bağ sahibiyken satüre (doymuş) yağ asitlerinde çift bağ yoktur. ÇDYA birinci çift bağın yerine göre 4 alt gruba ayrılır:

1. omega-3 (n-3),

2. omega-6 (n-6),
3. omega-7 (n-7),
4. omega-9 (n-9) yağlardır.

n-3 ve n-6 grubu esansiyeldir. Linoleik asit n-6 grubundadır ve en fazla soya, ayçiçek gibi bitkisel yağlarda bulunur. Linolenik asit ise n-3 grubundadır ve bazı bitkisel yağlarda bulunur. Linolenik asidin uzun zincirli deriveleri olan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahegzaenoik asit (DHA) en çok balık yağında bulunur. Linoleik asit araşidonik asitin prekürsörüdür. Araşidonik asit ise tromboksan A2 (TxA2), prostoglandin E2 (PGE2) ve lökotrien B4 (LTB4) gibi eicosanoidlerin üretilmesini sağlar ki bunların güçlü inflamatuvar etkileri vardır (154). Araşidonik asit ise tromboksan A2 (TxA2), prostoglandin E2 (PGE2) ve lökotrien B4 (LTB4) gibi eicosanoidlerin üretilmesini sağlar ki bunların güçlü inflamatuvar etkileri vardır. PGE2 süperoksit oluşumuna yardım eder, kompleman kaskadı için gerekli ürünlerin sentezini inhibe eder, hipersensitif cevabı geciktirir ve tümör büyümesini artırır. TxA2 trombosit agregasyonunu ve düz kas kontraksiyonunu artırır. LTB4 ise güçlü bir kimyasal uyarıcıdır. Özetle n-6 yağ asitleri inflamasyonu uyaran ajanların salınımını artırır ve vazokonstriksiyon yaparken aynı zamanda immün sistemin bakterilerle mücadele ve eliminasyon kapasitesini de inhibe eder (146). Linolenik asit (n-3) ise EPA ve DHA prekürsörüdür. Bunlar PGE3, TXA3 ve LTB5 salımını artırır. Bu grup eicosanoidler araşidonik asit ürünlerinden % 90 daha az biyolojik aktiviteye sahiptirler. Bu nedenle artma eğilimindeki trombojenik ve inflamatuvar cevabı baskırlar. Sentezleri konakta vazodilatasyon yapar. Eicosanoid sentezinin erken döneminde n-3 ve n-6 yağ asitlerinin birlikte kullanımı araşidonik asitten PGE2 ve LTB4 üretimini engeller (147). n-3 PUFA alınımındaki artma sitokin üretimi ve fonksiyonlarını etkiler. Diyetle n-3 PUFA alınması tümör nekrozis faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1) üretimini azaltır (148). n-6 yağ asitleri en çok soya ve ayçiçek yağında bulunur ve birçok parenteral ve enteral formülasyonda kullanılan uzun zincirli trigliseritlerin (LCT) kaynağıdır. Bu yağların besin maddesi olarak tek başına kullanılmaları, potansiyel zararlı prostoglandinlerin artmasına neden olabilir. Yeni verilere göre, eicosanoid sentezini besinlerle modifiye etmek mümkün ve bunun en kolay yolu n-3 ve n-6 yağ asitlerini kombine etmektir. Alexander ve arkadaşları (149) total vücut alanınının % 30'unda yanık oluşturulmuş domuzlara ayçiçek ve balık yağı verdiklerinde, n-3 olan grupda daha iyi bir immün

cevap saptadılar. Bu grubun vücut ağırlığı daha iyiydi ve metabolizma hızları diğer grupdan daha düşüktü. Peritonit oluşturulan domuzlarda yapılan bir başka çalışmada 5 farklı kompozisyonda yağ kullanılarak en iyi hayatta kalma süresi eşit oranlarda balık ve ayçiçek yağı ile beslenen grupta elde edildi (150). Deniz balıklarını çok tüketen popülasyonlar üzerinde yapılan birkaç epidemiyolojik çalışmada; aterosklerozis, otoimmün, inflamatuvar ve allerjik hastalık, kolon, meme ve prostat kanseri insidanslarının daha düşük olduğu görülmüştür. Daha sonra, balık yağı desteği kullanılarak yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda omega-3 yağ asidlerinin inflamatuvar ve trombotik reaksiyonlara, inflamatuvar kaşeksi ve kanser gelişimine karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Belirtilen diğer bir olumlu etkisi de organ transplantasyonu sonrasında doku mikroperfüzyonunun iyi durumda tutulmasına sağladığı katkıdır. Daha yeni bulguların bazıları da omega-3 yağ asidlerinin kardiyak aritmi ve ventrikül fibrilasyonuna karşı koruyucu etkisidir (151). Omega-3 yağ asitleri bu olumlu sonuçları farklı düzeylerde gösterdikleri etkilerle ortaya çıkarırlar. Hücre membran fosfolipidlerine katılarak membran akışkanlığında artışa, iyon kanallarının açılmasının modüle edilmesine, membran reseptörleri ve enzimlerinin fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olurlar. EPA, farklı prostaglandinlerin, tromboksan ve lökotrienlerin üretimi için araziidonik asid ile direkt olarak rekabete girer. Araşidonik asitten türeyen eikosanoidler genellikle proinflamatuvar ve protrombotik iken, EPA'dan türeyen benzer mediatörlerin benzer etkileri çok daha zayıftır. Son gelişmeler, membran fosfolipidlerine katılan omega-3 yağ asidlerinin hücre sinyallerini etkileyerek çeşitli uyarılara verilen yanıtları ve hücre içi metabolizmayı düzenlediğini göstermektedir. Bunun genel sonucu hücre proliferasyonunda azalmadır. Bunların yanında, omega-3 yağ asitleri bazı nükleer transkripsiyon faktörlerini modüle ederek gen ekspresyonunu etkilerler. Bu etkiler genel anlamda inflamatuvar yanıtta azalmaya, hücre antioksidan defans mekanizmasında güçlenmeye ve yağın hücre içinde depolanması yerine oksidasyonunun artmasına neden olmaktadır. Omega-3 yağ asitleri immünonütrisyon kavramı ile ilişkili olmakla birlikte, immün sistemde hücre proliferasyonuna direkt etkileri stimülasyon değil inhibisyonudur. Bununla birlikte, araziidonik asit kükenli prostaglandinlerin fazla miktarda salınımı nedeni ile immün yanıtta bozukluk ortaya çıktıysa, omega-3 yağ asidlerinin modifiye eikosanoid dengesi yolu ile sağladıkları indirekt etki bu bozukluğu ortadan kaldırabilir. Omega-3 yağ asidlerinin inflamasyon, doku perfüzyonu,

kardiak aritmiler ve hücre metabolizması gibi çok önemli olaylar üzerinde etki göstermeleri yalnızca kronik durumlarda değil, akut hastalıklarda da kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Teorik olarak, omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin bir diyet vazodilatasyon ve uzamış kanama zamanlarına neden olabilir. Her ne kadar omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri verilen kritik hastalarda, uzamış kanama zamanı görülme de platelet fonksiyon bozukluğu riski bir kaygı olarak devam etmektedir. Konuya işaret eden çalışmalar az sayıda hasta içermektedir. Omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri kullanımı ile ilgili daha ciddi endişeler, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri içeren diyetlerin lipid peroksitleri oluşumuna ve doğal serbest radikal toplayıcısı vitamin-E'nin tükenmesine neden olduğunun anlaşılmasıdır. Serbest radikaller ve lipid peroksitler hücre ve doku hasarı yaratırlar ve omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri kullanımı ile artış gösterebilecek multiorgan yetmezliği gelişimini destekleyebilirler (151).

Bu endişelerin klinik kullanımda geçerli olup olmadığı ya da lipid peroksitlerindeki potansiyel artışın, eş zamanlı vitamin-E uygulaması ile önlenabilirliği bilinmemektedir (152).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney, Hayvan Etik Kurul onayı alındıktan sonra Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Laboratuvarında, ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi, 80 erişkin erkek rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar randomize olarak 4 eşit gruba ayrıldı. Denekler iki haftalık çalışma süresince;

Grup I (Kontrol grubu) = normal rat diyeti ve su ile;

Grup II = 195 kcal/hafta/rat, izokalorik izonitrojenik standart enteral diyet (Isosource[®], Novartis. Protein:4.1 gr, karbonhidrat:14.2 gr, yağ:3.5 gr, doymuş yağ asidi:0.95 gr, MCT:0.62 gr, çoklu doymamış yağ asidi:1.2 gr, tekli doymamış yağ asidi:1.4 gr, enerji:105 kcal/100 ml)

Grup III = 195 kcal/hafta/rat, L-arginin, omega-3 yağ asidi ve RNA (Impact[®], Novartis. Protein:5.6 gr, karbonhidrat:13.4 gr, arjinin:1.3 gr, yağ:2.8 gr, doymuş yağ asidi:1.6 gr, MCT:0.6 gr, çoklu doymamış yağ asidi:0.58 gr, omega-3 yağ asidi:0.33 gr, enerji:101 kcal/100 ml) içeren diyet,

Grup IV = 195 kcal/hafta/rat, glutamin içeren diyet (Novasource Start[®], Novartis. Protein:5 gr, karbonhidrat:8.1 gr, glutamin:1 gr, yağ:2.5 gr, doymuş yağ asidi:1.35 gr, MCT:1.25 gr, çoklu doymamış y.a.:0.67 gr, enerji:75 kcal/100 ml) uygulandı.

İkinci haftanın sonunda; ratlarda halotan ile anestezi oluşturuldu. Skalpa orta hat insizyonu yapılarak periost diseke edildi. Çapı 10 mm olan metal bir disk, orta hatta koronal ve lambdoid sütürler arasına gelecek şekilde kranyuma yapıştırıldı. Pleksiglas tüp içerisinde bulunan 450 gr ağırlığında metal disk, 1 m yüksekten düşürülerek Marmarou ve ark. (153) tarafından tanımlanan yöntemle diffüz kafa travması oluşturuldu. Travmadan 2 sa sonra ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Sakrifikasyonu takiben beyin dokuları mümkün olduğunca atravmatik olarak boyundan başlayan diseksiyon ile kafatasından çıkarıldı. Beyin dokuları biyokimyasal ve histolojik incelemeler için interhemisferik kesi yapılarak ikiye ayrıldı.

Histolojik Değerlendirme

Beyin dokuları direkt %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 sa süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilen-eozin ile boyanır iken, diğer kesitlere apoptotik hücre belirlenmesi için TUNEL yöntemi, NOS dağılımı ise indirekt immünoperoksidaz tekniği ile incelendi.

Parafin doku takibi: Tespit edilen beyin dokuları, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dk %60'dan %95'e artan oranlarda etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dk 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dk iki değişim ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dk 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 30'ar dk parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

Hematoksilen-Eozin boyaması: Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan oranlarda alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. 2 dk hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

TUNEL Boyaması: Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (1 684 817, In situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche, Mannheim, Germany) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dk bekletildi. Kesitler 15 dk %4'lük paraformaldehit ile 10 dk muamele edildikten sonra, 10 dk 20-µg/ml proteinase K ile inkübe edildi ve ardından tekrar 3 defa 5'er dk tampon solusyonu ile yıkandı. İkinci kez %4'lük paraformaldehit 5 dk uygulanıp yıkandıktan

sonra, equilibration tampon solüsyonu ile 5 dk yıkanan kesitler TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de 1 sa inkübe edildi. 10 dk %22 NaCl ve % 11 Sodyum sitrat içeren solüsyon ile uygulanan kesitlere tampon solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. Ardından tampon solusyonu ile oda sıcaklığında 10 dk yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz enzimi ile 30 dk inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda herbir alanda 100 hücre sayılarak, bunlardan kaçının pozitif oldukları belirlendi. Bu sayım işlemi, her bir örnekte farklı 5 alanda sayılarak değerlendirildi.

İndirekt İmmünohistokimya Boyaması: Alınan beyin kesitleri

immünohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki sa değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dk bekletildi. Dakopen (IM3580, İmmünotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dk tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dk fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitler 1 sa bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edidi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-eNOS (RB-1711-PO, Neomarkers, Fremont CA, USA), anti-iNOS (RB-1605-PO, Neomarkers, Fremont CA, USA) ve anti-nNOS (61-7000, Zymed, San Francisco, USA) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dk boyandı. Yine üç defa 5'er dk tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (TA-002-HAC, Lab Vision, frmont, CA) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı.

Biyokimyasal Değerlendirme

Çıkarılan dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra bisturi ile uygun parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üzerine 0.2 M Tris-HCl, pH:7.5 eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 13000 devir dk-1 hızda 3 dk homojenize edildi (IKA-T25 basic, UK). Elde edilen bu homojenattan MDA ve protein tayini yapıldı. Homojenat +4 0C de 3000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatandan Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite ve protein tayini yapıldı. Elde edilen süpernatan 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol karışımı ile vorteksenerek cam tüpte 3220 rpm/40 dk +4⁰C de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

Malondialdehit (MDA): Doku MDA tayini, Ohkawa'nın (154) metoduna göre spektrofotometrik (Shimadzu UV-1201V, Japan) olarak gerçekleştirildi. Eksternal standart eğrisi, 1,1,3,3-tetraethoksiopropan kullanılarak hazırlandı. MDA seviyeleri nanomol mg⁻¹ doku proteini olarak ifade edildi.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px organizmada lipidperoksit ve hidrojenperoksit gibi zararlı peroksitlerin indirgenmesini katalizler. Bu indirgenme esnasında redükte glutasyon (GSH), okside glutatyona (GSSG) dönüşür. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasında oluşan absorbans değişiminin 340 nm'de okunması ile tayin edildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD): Sun ve ark. (155) tariflediği metoda göre; ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon bileşiği oluşturur ve bu kompleks 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme maksimum olup mavi-mor renk oluşumu belirgin izlenir. Ortamda SOD bulunması süperoksit radikalini dismute edeceğinden NBT'nin indirgenmesi azalır ve renkli formazon oluşumu enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak inhibe olur.

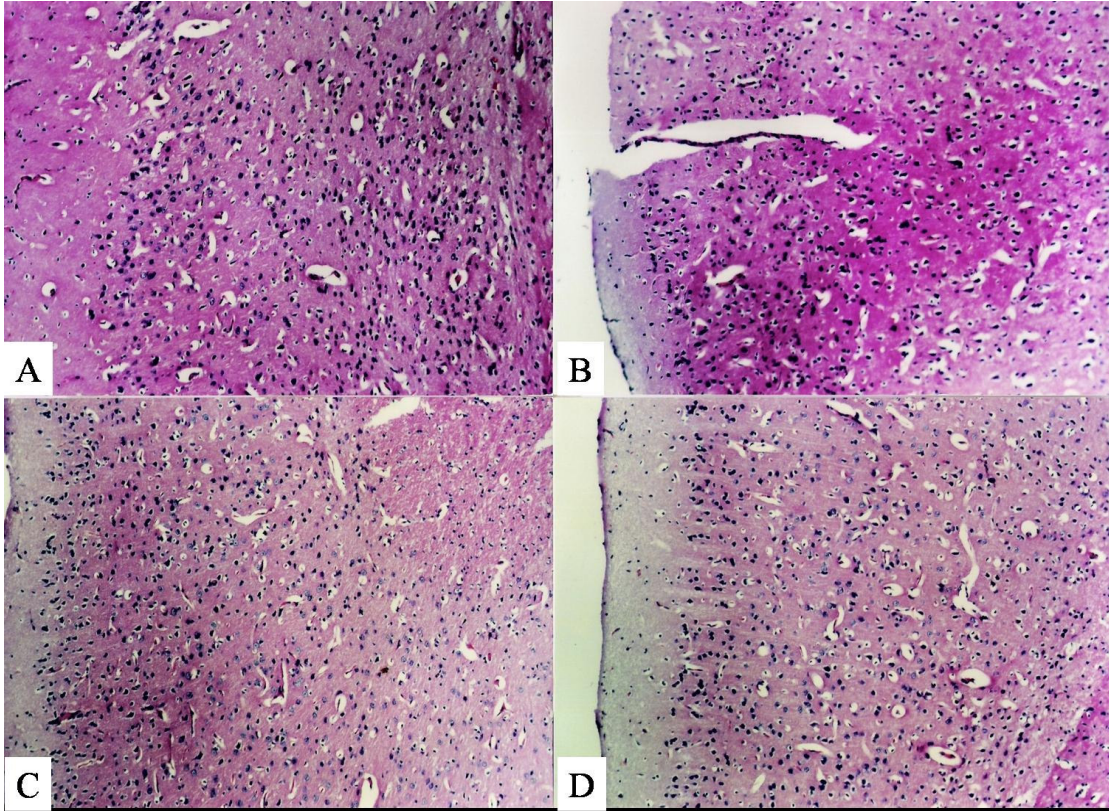
İstatistiksel Analiz

Elde edilen histolojik skora ve TUNEL verileri ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı ve $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grupların MDA, GSH-Px ve SOD değerlerinin analizinde One Way ANOVA testi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Histokimyasal İnceleme

Beyin dokusunun H-E ile boyandıktan sonra incelemesi sonucunda tüm gruplarda beyin dış kısmında gri cevherden oluşmuş korteks ve iç tarafta yerleşim gösteren beyaz cevherden oluşmuş medulla kolaylıkla seçiliyordu. Hücresel ayrıntılı olarak incelendiğinde ise yine tüm gruplarda kortekste bulunan bazı nöroglia hücrelerinin piknotik çekirdeğe sahip olduğu gözlemlendi. Bununla beraber piramidal hücrelerin ise normal yapılarını korudukları gözlemlendi (Resim 1).

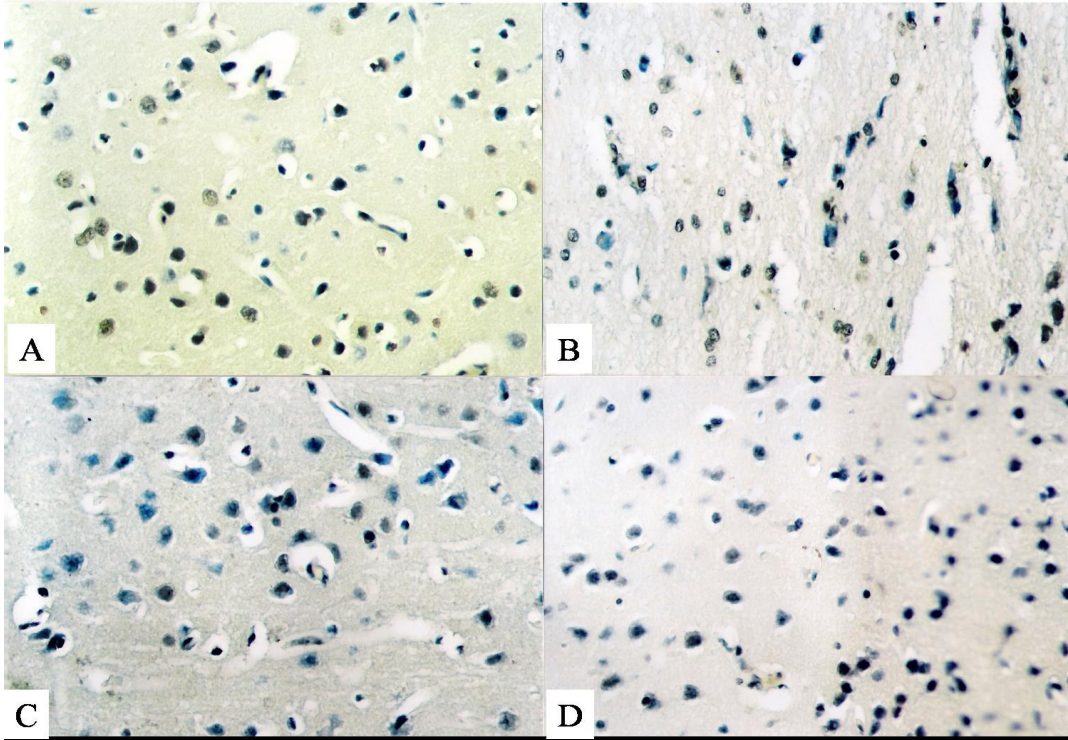


Resim 1. Grup I (A), Grup II (B) , Grup III (C) ve Grup IV (D) beyin dokularının H-E ile boyanmış görüntüleri. X100 (Orijinal büyütme)

TUNEL Tekniği ile İnceleme

Dokudaki apoptotik hücrelerin tespiti amacı ile yapılan TUNEL boyaması sonucunda tüm gruplarda TUNEL pozitif hücreler kahverengi olarak saptandı. TUNEL pozitif hücreler her bir grup örneklerinde elde edilen seri kesitlerin

boyanması sonucunda her bir kesitte 3 farkı alanda 100 hücre sayılarak bunlardan TUNEL pozitif hücreler oranı tespit edildi. TUNEL pozitif hücrelerin esas olarak kortekste bulunan nöroglia hücrelerinde olduğu ve piramidal hücrelerin ise TUNEL negatif oldukları saptandı. TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de 14.7 ± 0.75 oranında, Grup II'de 11.5 ± 0.62 , Grup III'de 5.1 ± 0.57 ve Grup IV'de ise 7.6 ± 0.7 olduğu saptandı. İstatistiksel olarak değerler karşılaştırıldığında Grup III ve Grup IV'deki TUNEL pozitif hücre sayıları arasında farkın olmadığı ($p > 0.05$), ancak diğer gruplar arasındaki karşılaştırmaların ise anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$) (Resim 2).



Resim 2. Grup I (A), Grup II (B), Grup III (C) ve Grup IV (D) beyin dokularının TUNEL tekniği kullanılarak boyanmış görüntüleri. (TUNEL pozitif hücreler kesit üzerinde koyu kahverengi olarak seçilmekte) X400 (Orijinal büyütme)

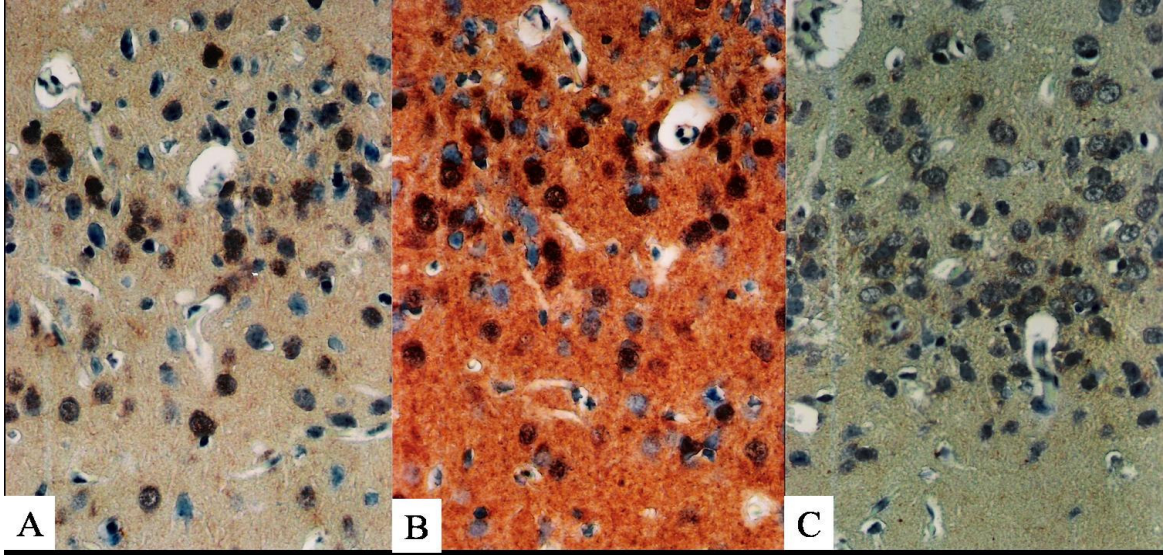
İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda pozitif immünoreaktiviteler dokuda kiremit kırmızısı olarak tespit edildi. iNOS immünohistokimyası sonucunda hücreler arası alanda gözlenen boyama nonspesifik olarak kabul edildi ve sadece

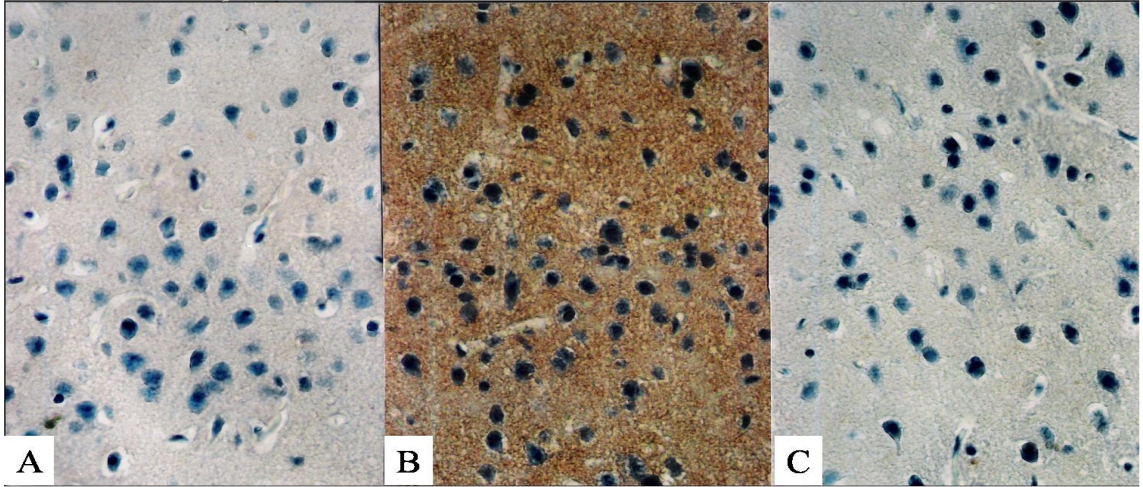
hücre boyanmaları pozitif olarak kabul edildi. Tüm gruplarda pozitif immünoaktivitenin özellikle korteksin dış piramidal tabakasında bulunan hücrelerde pozitif olduğu gözlemlendi. Grup I'in immünohistokimyasal boyaması sonucunda eNOS ve iNOS immünoaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu, nNOS immünoaktivitesinin ise orta şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 3). Bununla beraber Grup II' de ise eNOS, iNOS ve nNOS immünoaktivitelerinin negatif olduğu gözlemlendi (Resim 4). Grup III de ise eNOS ve iNOS immünoaktiviteleri orta şiddette iken, nNOS immünoaktivitesinin çok zayıf şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 5). Grup IV de ise eNOS immünoaktivitesi zayıf şiddette, iNOS ve nNOS immünoaktiviteleri ise negatif olarak değerlendirildi (Resim 6). İmmünohistokimyasal sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Grupların immünohistokimyasal sonuçlarının karşılaştırılması.

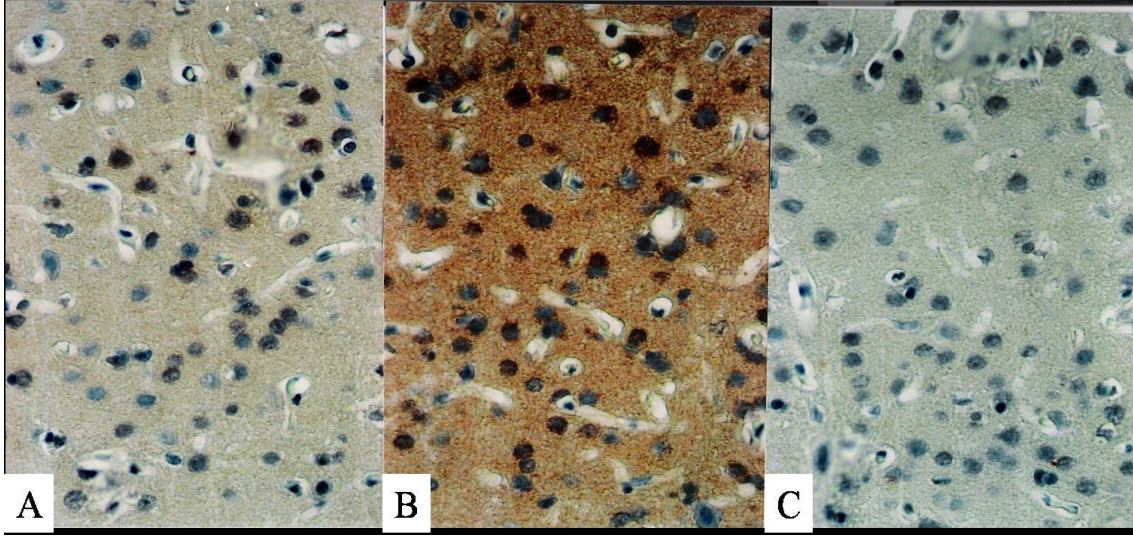
Gruplar	eNOS	iNOS	nNOS
Grup I	+++	+++	++
Grup II	-	-	-
Grup III	++	++	±
Grup IV	+	-	-



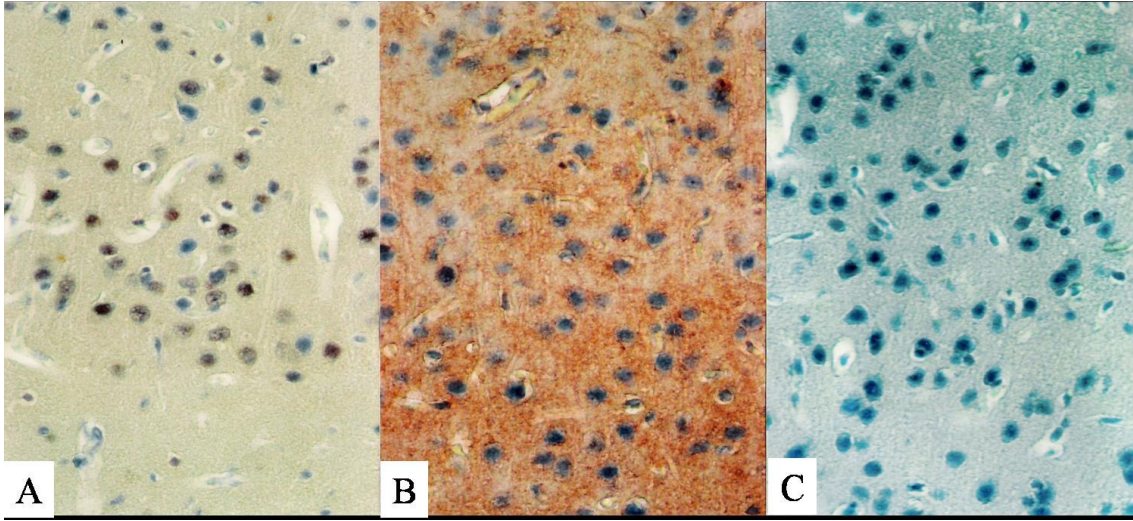
Resim 3. Grup I'de eNOS (A), iNOS (B) ve nNOS (C) immünoaktiviteleri. Kontrol grubunda her üç NOS immünoaktivitesinin pozitif olduğu gözlemlendi. X400 (Orijinal büyütme)



Resim 4. Grup II'de eNOS (A), iNOS (B) ve nNOS (C) immünoaktiviteleri. Grup II'de eNOS, iNOS ve nNOS immünoaktivitelerinin negatif olduğu gözlemlendi. X400 (Orijinal büyütme)



Resim 5. Grup III'de eNOS (A), iNOS (B) ve nNOS (C) immünoaktiviteleri. X400
(Orijinal büyütme)



Resim 6. Grup IV'de eNOS (A), iNOS (B) ve nNOS (C) immünoaktiviteleri. X400
(Orijinal büyütme)

Biyokimyasal Sonuçlar

Grupların MDA seviyelerinin karşılaştırılmasında Grup II'de Grup I, III ve IV'e göre daha yüksek saptandı ($p<0.05$). SOD seviyeleri Grup IV'de diğler gruplara göre daha yüksek saptandı ($p<0.05$). GSH-Px düzeyleri karşılaştırılmasında Grup IV'de diğler gruplara göre daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Grupların MDA, GSH-Px ve SOD düzeyleri

	Grup I (n=20)	Grup II (n=20)	Grup III (n=20)	Grup IV (n=20)
MDA (nmol/mg protein)	0.22±0.7	0.46±0.55*	0.32±0.07	0.35±0.02
GSH-Px (µg protein)	63.49±22.6	56.2±19.3	66.8±43.7	92.25±32.1*
SOD (µg protein)	2.19±0.95	1.88±0.52	1.58±0.51	4.47±1.7*

*: $p<0.05$

5. TARTIŞMA

Standart ve immünonutrient ilave edilmiş ürünler ile sağlanan enteral nütrisyona, travmatik diffüz beyin hasarında histokimyasal ve biyokimyasal değişiklikler üzerine etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmamızda; immünonütrisyona ile beyin dokusunda apoptotik hücre sayısının anlamlı oranda azaldığı, immünohistokimyasal incelemede kontrol grubuna göre NOS izoenzimlerinde azalmanın olduğu, biyokimyasal değerlendirmede ise standart nütrientlerle beslenme sırasında serbest oksijen radikallerinde artma gözlenirken immünonütrisyona antioksidan aktivitenin arttığı saptandı.

Kafa travmalarından sonra gelişen diffüz aksonal hasar, travmaya bağlı mortalite ve morbiditenin nedenlerindedir. Bu çalışmada, Marmarou ve ark. (153) tarafından geliştirilen, ivmeyle çarpma tarzında ve diffüz aksonal hasar ile klinik özellikler açısından benzer bir kafa travması modeli kullanıldı. Diffüz hasarın meydana geldiği bu model ile travmadan sonra beyin ödemi ve sekonder hasar da oluşmaktadır.

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, çok hücreli organizmaların normal gelişimlerinin yanı sıra doku homeostazisinin sürdürülmesinde de temel reaksiyondur (156). Apoptozis genetik olarak tanımlanmış, hasarlı ya da enfekte organizmalara karşı immünojenik bir tepkidir. Ayrıca apoptozis memeli morfogenezi sırasında organları şekillendiren ve dokuların büyüklüğünü düzenlemede mitozla zıt rol oynayan aktif bir işlemdir (157). Travma gibi mekanik doku hasarı, endotoksin sekresyonu, çoğunlukla bakteriyel translokasyonun neden olduğu mikrobiyal invazyon, şok gibi global perfüzyon bozuklukları ve tromboemboli gibi bölgesel perfüzyon bozuklukları vital organ apoptozisine neden olur (156,158). Çalışmamızda travmatik beyin hasarı uygulanan ratlarda, immünonutrientlerin kullanıldığı gruplarda kontrol ve standart beslenme uygulanan gruplara göre apoptotik hücrelerin daha az oranda olduğu görüldü. Travmatik diffüz beyin hasarı sonrası uygulanmakta olan immünonütrisyona erken dönemde apoptozisi önlediği saptandı.

Kafa travmalı hastaların beslenmesinde amaç günlük enerji ve protein gereksinimini sağlamanın yanı sıra nörolojik fonksiyonları korumak, vücut kitle

kaybını önlemek, hipermetabolik ve hiperkatabolik yanıtları en aza indirmektir (159,160). Travmatik beyin hasarında, klinik olarak uygulanabilir olduğunda, belirgin ekonomik ve fizyolojik yararları ve daha az ciddi komplikasyonları nedeniyle enteral nütrisyon tercih edilmektedir (161,162).

İmmün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesini içeren ve immünonütrisyon olarak bilinen beslenme yöntemi için birçok ürün günümüzde klinik kullanıma uygundur. Malnütrisyon, immün sistemi deprese ederken, beslenme bu etkiyi tersine çevirmektedir. İmmünonütrisyon, izokalorik-izonitrojenik kontrol formüllerle karşılaştırıldığında, klinik sonucu iyileştirme, immün fonksiyonu modüle etme amacıyla spesifik besin maddelerinin enteral veya parenteral yöntemler ile verilmesini tariflemektedir (84,85). Glutamin ve arjinin, immün sistem üzerine farmakolojik etkileri gösterilen önemli besin öğeleridir.

Ciddi hastalık durumunda özellikle travma ve enfeksiyonlarda glutamin ihtiyacı belirgin şekilde artabilir ve kullanımı endojen üretimi aşabilir. Houdijk ve ark. (163)'nın çoklu travmalı hastalarda yaptıkları çalışmada; glutamin içeren beslenme ürünü uygulananlarla izokalorik-izonitrojenik beslenme alan kontrol grubuna göre pnömoni, sepsis ve bakteriyemi sıklığının belirgin derecede azaldığı bildirilmiştir. Glutamin alan grupta glutamin ve arjinin seviyelerinin daha yüksek olduğu, proinflamatuvar molekül tümör nekrozis faktör seviyelerinin de daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak kontrol grubuyla kıyaslandığında mortalitede herhangi bir farklılık bulunmamıştır (163). Glutamin içeren beslenme ürünlerinin nitrojen ve aminoasit metabolizması üzerine etkilerini inceleyen ilk araştırmacılar Furst ve ark. (130) olmuştur. Travmalı hastalara ve batin ameliyatı yapılan hastalara alanin ve glutamin içeren parenteral beslenme ürünü uygulamışlardır. Griffiths ve ark. (164) travma hastalarında glutamin içeren parenteral beslenmenin morbidite ve mortalite üzerine etkisini değerlendirdikleri randomize, çift kör çalışmada, intraabdominal girişimler nedeniyle enteral beslenme alamayan yada 48 saatten uzun bir süre enteral ürünlere intolerans gösteren 84 yoğun bakım hastasında, sadece 5 gün glutamin alan grupta, travma sonrasında 6 aylık sağkalımı daha yüksek saptamışlar ve bu hastalarda tedavi maliyetlerinin de azaldığını belirtmişlerdir.

Glutaminden zengin enteral besinlerin, ratlarda in vivo olarak NO biyosentezinin potent inhibitörü oldukları gösterilmiştir (116). Son yıllarda dikkati çeken ve birçok biyolojik olayda önemli rolü olan NO, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir (42,43). NO vasküler relaksasyon, nörotransmitter etkiler ve

sitotoksiste gibi çeşitli hücrel olaylarda ikincil haberci olarak yer almaktadır (42, 43). Glutamin tek başına NOS aktivitesini inhibe etmez, ancak glutamin metabolizmasının endotelial NO sentezinin düzenlenmesindeki etkisine gereksinim duyulabilir (118). Sonuç olarak, glutamin endotelial NO sentezinin fizyolojik inhibitörüdür (119). Ayrıca glutaminin glukozamine metabolize olması endotelial NO sentezinin inhibisyonunda gereklidir. Çalışmamızda glutaminden zengin enteral ürünle beslenen ratlarda travmatik beyin hasarı sonrası kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, iNOS ve nNOS aktivitesi görülmezken eNOS aktivitesinde anlamlı bir azalma saptandı.

Arjinin önemli immün fonksiyonları bulunan NO'in prekürsörüdür (131). Arjininin deaminaz yolu ile sitriline dönüşümü nedeniyle in vivo ve in vitro NO yapımında önemli bir madde olduğu gösterilmiştir (165). Çalışmamızda arjinin içeren enteral ürünle beslenen ratlarda kontrol grubuna göre tüm NOS izoenzim aktivitelerinde azalma saptandı.

Glutamin glutamat, sistein ve glisin aracılığı ile glutatyon sentezinin öncüsüdür, hücrelerin içinde indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSG) şeklindedir. GSH/GSSG oranı redoks potansiyelinin en önemli belirleyicisidir. Glutamin verildiğinde hücre içindeki GSH güçlenir ve redoksa duyarlı kinazların aktiviteleri azalır (166). Glutamin, GSH konsantrasyonunu artırır. GSH metabolizması immün hücrelerdeki apoptozis olayı ile yakından ilgilidir. T lenfositlerde zaten az olan glutatyon içeriği apoptozis sırasında kromafin parçalanmasının başlaması ile beraber daha da azalır. İntrasellüler GSH artışının apoptozisi azaltmada da etkili olduğu bildirilmiştir (166).

SOR'nin zararlı etkilerine karşı glutamat düzeylerini artırması açısından glutamin önemli bir moleküldür (126). Glutamin, glutatyon prekürsörü olduğundan, diyetle glutamin uygulamasının oksidatif stresten kaçınmada ve glutatyon düzeylerini yüksek tutmada kullanılabileceği bildirilmiştir (126). Yüksek SOD aktivitesi olan astrositlerin, oksidatif hasara karşı direncinin de arttığı bildirilmiştir (167). Astrositlerin oksidatif hasara karşı gösterdikleri bu direnç, GSH-Px ve CAT aktivitesinden başka diğer faktörlere de bağlıdır. Bununla beraber, GSH beyinde antioksidan durumun kontrolünde ana moleküldür (167). Çalışmamızda özellikle glutaminli enteral diyetle beslenen ratların beyin dokusunda kontrol grubuna göre antioksidan GSH-Px enzimlerinde artışın olduğu gösterildi.

Serbest radikaller, LPO başlatan temel maddelerdir (32). Travmatik beyin hasarında SOR'nin, endotel hücre hasarına bağlı olarak kan beyin bariyerini bozdukları veya direkt etki ile beyin ödeme veya nöronlarda yapısal değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir (35, 36). Kafa travması sonrası beyin dokusunda oksidatif stres ve LPO arttığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (153). Pratico ve ark.'nın (168) yaptığı bir çalışmada, deneysel travma sonrası LPO'nun lokal ve sistemik etkilerini araştırmışlar, LPO son ürünü olan MDA düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Kontos ve ark.'nın (169), yaptıkları kafa travması deneyinde, artmış fosfolipaz C ve araşidonik asit metabolizması ürünleri sonucu serebral arteriyollerde hasar olduğu ve bu hasarın bir siklooksijenaz inhibitörü olan SOD ile önlenebileceği bildirilmiştir. Önemli bir sonuç da, süperoksit oluşumunun kafa travması sonrası en az bir saat devam ettiğidir (170,171,172). Olesan ve ark. ise (52), serbest oksijen radikallerinin kurbağa pial venüllerinde elektriksel direnci azalttıklarını ve iyonik permeabiliteyi artırdıklarını, bu durumun SOD ve katalaz ile önlenebileceğini yayınlamışlardır. Spinal kord ve beyin hasarında malondialdehit (MDA) oluşumu artar, membran kolesterolü yıkılır, önemli antioksidanlardan olan askorbik asit ve alfa tokoferol gri ve beyaz cevherde hızla tüketilir (10,173). Travma sonucunda sodyum, potasyum, adenosin trifosfataz pompasının aktivitesinin inhibisyonu, dokudaki LPO'nun erken sonuçlarından birisidir. Akut santral sinir sistemi ve travmatik beyin yaralanmalarında SOR bağımlı bu LPO, fizyopatolojinin temelini teşkil eder (34,35). Çalışmamızda grupların MDA seviyeleri, standart izokalorik-izonitrojenik enteral beslenme grubunda, standart rat diyeti, arjinin ve glutaminden zengin diyetle beslenen ratlara göre daha yüksek seviyelerde saptandı. Buna karşın antioksidan SOD seviyeleri glutaminden zengin enteral beslenme uygulanan gruplarda daha yüksekti. Glutaminden zengin diyetle beslenmenin, travmatik beyin hasarında ödem ve doku iskemisini başlatan en önemli neden olan ve endotel hücre hasarı, kan beyin bariyerinde bozulma ve glial hücrelerde yapısal değişikliklere yol açabilen serbest oksijen radikallerine karşı beyin dokusunda GSH-Px ve SOD düzeylerinde artışı sağlayarak sekonder hasara karşı koruyucu olduğu düşünüldü.

6. SONUÇ

İmmün sistemin etkinliğini artırmak amacıyla glutamin ve arjinin gibi özel besinler verilerek uygulanan immünonütrisyondun, GİS üzerine yararlı etkileri gösterilmesine karşın direkt serebral hasarlanmadaki etkileri üzerine bir araştırma bulunmamaktadır. Travmatik beyin hasarında mekanik etkinin neden olduğu primer doku hasarı geri döndürülemediği için tedavi çabaları, biyokimyasal veya fizyolojik olayların neden olduğu sekonder beyin hasarını önlemeye yönelik olmalıdır. Kafa travmalı hastalarda enerji gereksinimini karşılayan, immünolojik durumu düzeltmede, yara iyileşmesinde ve daha iyi nörolojik sonuca ulaşmada yardımcı olacak yeterlilikte bir nütrisyond desteğinin uygulanması gereklidir.

Bu çalışmada, standart ve immünonütrient ilave edilmiş ürünlerle sağlanan enteral nütrisyondun, deneysel travmatik diffüz beyin hasarında histokimyasal ve biyokimyasal değişiklikler üzerine etkileri değerlendirildi. Glutamin ve arjinin, omega-3, RNA ile immünonütrisyond uygulamasının beyin dokusunda apoptotik hücre sayısını anlamlı oranda azalttığı, immünohistokimyasal incelemede kontrol grubuna göre NOS izoenzimlerinde anlamlı azalmanın olduğu, biyokimyasal değerlendirmede ise standart nütrientlerle beslenme sırasında SOR'inde artma gözlenirken, immünonütrisyondla antioksidan aktivitede artış olduğu gözlendi.

Sonuç olarak; deneysel travmatik beyin hasarında immünonütrisyondun, sekonder doku hasarının nedeni olarak gösterilen, SOR ve LPO ve NOS izoenzimlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi üzerine yararlı etkileri olduğu gösterildi. Kritik hastalıklar sırasında farklı bireylerin çok farklı immünonütrientlere gereksinim duyabilmesi ve bu gereksinimlerin hastalık ilerledikçe değişebilmesi nedeniyle immünonütrisyondun klinik hastalıklardaki yararları üzerine kesin bir görüş birliği oluşmamıştır. Klinikte immünonütrisyondun yararı ve kullanımı ile ilgili daha fazla araştırmaya gereksinim vardır. Bu hayvan modeli çalışmamız, klinik çalışmalara da yol gösterici olacaktır.

7. ÖZET

Bu çalışmada, standart ve immunonutrientlerle sağlanan enteral nutrisyonun deneysel travmatik beyin hasarında sekonder hasar üzerine etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amaçlandı.

Deney, ağırlıkları 180-220 gr arasında değişen Wistar albino cinsi, 80 erişkin erkek rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar randomize olarak 4 eşit gruba ayrıldı. Grup I iki haftalık çalışma süresince normal rat diyeti ve su ile beslenerek kontrol grubu olarak kabul edildi. Grup II, III ve IV'deki ratlara ise iki hafta süre ile 195 kcal/hf/rat olacak şekilde 3 ayrı beslenme ürünü verildi. Ürünler; Grup II'de izokalorik izonitrojenik standart enteral diyet (Isosource[®], Novartis), Grup III'e L-arginin, omega-3 yağ asidi ve RNA (Impact[®], Novartis) içeren diyet, Grup IV'e glutamin içeren diyet (Novasource Start[®], Novartis) olarak planlandı. İkinci haftanın sonunda; halotan ile anestezize edilen tüm ratlarda; skalpa orta hat insizyonu yapılarak periost disseke edildi. Çapı 10 mm olan metal bir disk, orta hatta koronal ve lambdoid sütürler arasına gelecek şekilde kranyuma yapıştırıldı. Pleksiglas tüp içerisinde bulunan 450 gr ağırlığında metal disk, 1 m yüksekten düşürülerek Marmarou ve ark. tarafından tanımlanan yöntemle diffüz kafa travması oluşturuldu. Travmadan 1 sa sonra ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Sakrifikasyonu takiben beyin dokuları mümkün olduğunca atravmatik olarak boyundan başlayan diseksiyon ile kafatasından çıkarıldı. Beyin dokuları biyokimyasal ve histolojik incelemeler için interhemisferik kesi yapılarak ikiye ayrıldı. Beyin dokuları direkt %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin ile boyanır iken, diğer kesitlere apoptotik hücre belirlenmesi için TUNEL yöntemi, NOS dağılımı ise indiekt immünoperoksidaz tekniği ile incelendi. Tüm ratlardan alınan beyin doku kesitlerinden malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeylerine bakıldı.

TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. TUNEL pozitif hücre sayısının Grup I'de %14.7±0.75 oranında, Grup II'de %11.5±0.62, Grup III'de %5.1±0.57 ve Grup IV'de ise %7.6±0.7 olduğu

saptandı. İstatistiksel olarak değerler karşılaştırıldığında ise sadece Grup III ve IV TUNEL pozitif hücre sayılarının anlamlı olmadığı ($p>0.05$), diğer değerlerin karşılaştırılmasında anlamlı olduğu ($p<0.01$) gözlemlendi. Grup I'in immünohistokimyasal boyaması sonucunda eNOS ve iNOS immünoaktivitesinin kuvvetli pozitif olduğu, nNOS immünoaktivitesinin ise orta şiddette olduğu gözlemlendi. Bununla beraber Grup II'de ise eNOS, iNOS ve nNOS immünoaktivitelerinin negatif olduğu gözlemlendi. Grup III'de ise eNOS ve iNOS immünoaktiviteleri orta şiddette iken, nNOS immünoaktivitesinin çok zayıf şiddette olduğu gözlemlendi. Grup IV'de ise eNOS immünoaktivitesi zayıf şiddette, iNOS ve nNOS immünoaktiviteleri ise negatif olarak değerlendirildi. Grupların MDA seviyelerinin karşılaştırılmasında Grup II'de Grup I, III ve IV'e göre daha yüksek saptandı ($p<0.05$). SOD ve GSH-Px seviyeleri Grup IV'de diğer gruplara göre daha yüksek saptandı ($p<0.05$).

Sonuç olarak; deneysel travmatik beyin hasarında uygulanmakta olan immünonütrisyonun, sekonder doku hasarının nedeni olarak gösterilen, serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu ve NOS izoenzimlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi üzerine yararlı etkileri olduğu gösterildi.

8.SUMMARY

The aim of this study was to assess and compare the effects of enteral nutrition by standard nutrition and immunonutrients upon secondary injury in experimental traumatic brain injury.

80 adult Wistar albino male rats, weighing 180-220 gr were included to the study. Rats were randomly allocated into 4 equal groups. Group I was accepted as control group, nourishing with normal rat diet and water during 2 weeks of study. 3 different nutrition formulations (195 kcal/week/rat) were given to the rats in groups II, III and IV during 2 weeks. Group II received isocaloric, isonitrogenic standard enteral diet (Isosource[®], Novartis), Group III; L-arginin,omega-3 fatty acids and RNA (Impact[®], Novartis) , Group IV glutamin (Novasource Start[®], Novartis). At the end of the second week; periost of anesthetized rats via halotan were dissected by median line incision to the scalp. 10 mm diameter of a metal disc was stucked to the cranium of the rats at median line between coronal and lambdoid sutures. Diffused closed head injury was induced by the method as defined by Marmarou et al, using the 450 gr 2 m weight-height impact by releasing metal disc ,to the intact skull of the rats. Rats were sacrificed by cervical dislocation after 1 h of trauma. Following sacrification, brain tissues were dissected from the cranium as atraumatically as possible. Brain tissues were divided into 2 parts by interhemispheric incision for biochemical and morphological evaluation. Brain tissues were fixed in a 10% formalin solution and embedded in paraffin. They were stained with hematoxylin-eosin and examined for morphological alterations. Other sections were stained via TUNEL method in order to detect apoptotic cells. eNOS, iNOS and nNOS distributions were also detected using indirect immunoperoxidase technique. The levels of malondialdehyde, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were studied in the brain sections. TUNEL positive cells were more in Group I than Group II, III and IV. TUNEL positive cells were obtained as 14.7±0.75 % in Group I, 11.5±0.62 % in Group II, 5.1±0.57 % in Group III and 7.6±0.7% in Group IV, respectively. According to the statistical comparison; TUNEL positive cell count of Group III and IV were not meaningful (p>0.05). With respect to the comparison of other values, they were considered meaningful (p<0.01).

After immunohistochemical observation, while strong immunoreactivity of eNOS and iNOS, moderate staining of nNOS were detected in Group I, immunoreactivities of eNOS, iNOS and nNOS were absent in Group II. Moderate staining of eNOS and iNOS were detected in group III, immunoreactivity of nNOS was weak or absent in these brain tissues. Mild staining of eNOS was observed in Group IV, both iNOS and nNOS immunoreactivities were absent in this brain. MDA levels were found increased in Group II than Group I, III and IV due to biochemical evaluation ($p < 0.05$). SOD and GSH-Px levels were also found increased in Group IV than other groups ($p < 0.05$).

As a result; beneficial effects of immunonutrition were shown on modulation of NOS isoenzymes expression, free oxygen radicals and lipid peroxidation which were considered to be the cause of secondary tissue injury, in experimental traumatic brain injury.

9. KAYNAKLAR

1. Miller JD, Piper IR, Jones PA. Pathophysiology of head injury. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT, editors. Neurotrauma. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 61-70.
2. Marmarou A. Traumatic brain edema: an overview. Acta Neurochirurgia. 1994; 60: 425-424.
3. McIntosh TK. Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: a review. J Neurotrauma. 1993;10:215–261.
4. McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacological strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. J Neurotrauma. 1998;5:731–769.
5. Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. Trends Pharmacol Sci. 1992;13:29–35.
6. Tuğrul S, Demirel İ, Özcan E, Çakar N, Esen F. Kafa travmalı hastalarda farklı nütrisyon yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması. Türk Anest Rean Cem Mecmuası. 2002;30:111-117.
7. Vinnars E, Hammarqvist F, von der Decken A, et al. Role of glutamine and its analogs in posttraumatic muscle protein and amino acid metabolism. J Parenter Enter Nutr. 1990; 14:125-129
8. Kirk SJ, Barbul A. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. JPEN 1990;14:226S-229S
9. Pickard JD, Czosnyka M. Management of raised intracranial pressure. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1993;56:845-858.
10. Valadka AB. Injury to the cranium. In: Mattox KL, Felliciano DV, Moore EE, editors. Trauma. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2000, p.377-399.
11. Rakunt C. Kafa Travmaları. In: Şahinoğlu AH, editor. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. I.Baskı. Samsun:Türkiye Klinikleri;1992. 336-338.

12. Neave V, Weiss MH. Neurological evaluation of a patient with head trauma: coma scales. In: Wilkins HR, Rengacharty SS, editors. Neurosurgery. Mc Graw Hill Book Co; 1985;1570-1577.
13. Siesjo BK. Basic mechanisms of traumatic brain damage. Annals of Emerg Medicine.1993;22:959-969
14. Lynch DR, Dawson TM. Secondary mechanism in neuronal trauma. Current opinion in neurology. 1994; 7:510-516.
15. Seraslan Y, Çokluk C, İyigün Ö, Önder A, Rakunt C, Çelik F. Kafa travmaları (I) Sendrom 2000; 12(3):21-24.
16. Seraslan Y, Çokluk C, İyigün Ö, Önder A, Rakunt C, Çelik F ve ark: Kafa travmaları (II) Sendrom 2000; 12(3):25-29.
17. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema:The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990; 27:1-11.
18. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. CNS Trauma 1986;3:257-263.
19. Faden AI. Pharmacology in spinal cord injury. A critical review of recent developments. Clin Neuropharmacol 1987;10:193-204.
20. Barut Ş, Canpolat A, Bilge T, Aydın Y, Çokneşeli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury, time-level relationship. Neurosurg rev 1993;1:53-59.
21. Bradford HF, Ward HK, Thomas AJ. Glutamine:a major substrate for nevre endings.J. Neurochem. 1978;30:1453-1459.
22. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system. An overview. Intern J Neurosc. 1988;40:13-18.
23. Bilezikçi B, Haberal N.Serbest radikal teorisi ve yaşlanma. Sendrom. 2000;12:59-62.
24. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993;49(3):481-493.
25. Baykal Y,Gök F, Erikçi S. Demir, Serbest radikaller ve oksidatif hasar. Sendrom. 2002; 14(1):94-100.

26. Bekerecioğlu M, Uğraş S, Dilek O, Tercan M, Özyazgan I. Serbest radikaller. Sendrom 1998;10(3):85-95.
27. Ünal D. Serbest radikaller. Sendrom 1999; 11(3):68-80.
28. Chaudiere J, Ferrari-Illiou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 1999;37:949-962.
29. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. Sendrom. 2000; 12(9):31-39
30. Scott G. Antioxidants in vitro and in vivo. Chem Br 1985;6:648-653
31. Doberstein C, Gerald ER, Duncan QM. Neurosurgical Critical Care. In: Frederic SB, Darryl YS editors. Current Critical Care & Diagnosis and Treatment. 1st ed. Newyork: Appleton&Lange Co;1994.p533-544
32. Gennarelli TA. Mechanism of cerebral concussion, contusion, and other effects of head injury. In: Youmans JR, editor. Neurological Surgery. Third ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p.1953-1964.
33. Chestnut RM. Definitive care phased head injuries. In: Greenfield LJ, ed.. Surgery Scientific Principles and Practice. 2nd ed. Newyork: Lippincott-Raven Pub;1997.p2991-2998.
34. Ikeda Y, Anderson JH, Long DM. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. Neurosurgery. 1989; 24(5): 679-685.
35. Reiter RJ. Pineal melatonin. Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrin Reviews.1991; 12(2):151-180.
36. Kunday C, Özbek C, Hancı M, Uzan M, Kaynak MY, Özlen F, Gümüştaş K, Belge A, Kökoğlu E. Deneysel kafa travmasında laktik asidozun lipid peroksidasyonuna etkisi. Türk Nöroşirurji Dergisi.1994;4:78-82.
37. Baethmann A, Jansen M. Possible role of calcium entry blockers in brain protection. Eur Neurol 1986;25:102-114
38. Clendon NR, Allen H, Gordon WA, Bingham WGJ. Inhibition of Na-K activated ATPase activity following experimental spinal cord trauma. J Neurosurg 1978;49:563-568
39. Sinnet PM, Heikkila RE, Cohen G. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. J Neurochem. 1980; 34:1421-1428

40. Cohen G. Oxyradical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*. 1984;5:77-82
41. Weiss SJ, Bulgio AF. Biology of defence phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab invest*. 1982;47:5-18
42. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120:227:37.
43. Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994;134(4):1971-4.
44. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *British Journal of Surgery*.1995; 82:1598-1610.
45. Richard K. Nitric oxide synthases. *The Biochemist*.1994; 16(5): 3-6.
46. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The J. Biol. Chem.* 1993; 268 (17): 12231-4.
47. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298: 249-58.
48. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide:Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm Rev* 1991; 43: 109-41.
49. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney:Synthesis, localisation and function. *Am J Kidn Dis.* 1994; 24(1):112-29.
50. Ohishi K, Carmines P, Inscho EW. EDRF, Angiotensin II, in rat juxtamedullary afferent and efferent arterioles. *Am. J.Physiol.* 1992; 32: F900-6.
51. Katayama Y. Nitric oxide:Mysterious messenger. *Dojindo News Letter* 1995; 1:1-20.
52. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a keymolecule in migraine and other vascular headaches. *Trend Pharmacol Sci Engl* 1994; 15(5): 149-53.
53. Palacios M, Knowles RG, Palmer RJM and Moncada S. Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guany-latecyclase in adrenal glands. *Biochem ResCommun* 1989; 165: 802-9.

54. Muuruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165: 802-9.
55. Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:6328-32.
56. Durate ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of NO-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1991; 206:163-4.
57. Haeflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(7):2340-8.
58. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-402.
59. Burnett AI, Lowenstien CJ, Bredt DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 1992; 257: 401-403.
60. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic dysfunction disease. *Gastroenterology* 1992; 103:1928-1949.
61. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. *Am. J Kidn Dis.* 1994;24 (1): 112-129.
62. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. *Cardiovasc Drug Ther(USA).* 1994; 8(4): 601-610.
63. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. *The Biochemist.* 1994;16(5):15-22.
64. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB. Activated macrophages destroy intracellular leishmaniasis. *Ann Med (England).* 1995; 27(3):369-77.
65. Stadler J, Billiar TR, Curran RD. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:C910-6.
66. Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 193: 398-405.

67. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *American Journal of Medicine*. 2000;109:150-158.
68. Nieves C, Henken B. Arginine and immunity: a unique perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002;56:471-482.
69. Ochoa JB, Bernard AC, Mistry SK. Trauma increases extrahepatic arginase activity. *Surgery*. 2000; 127:419-426.
70. Angele MK, Smail N, Knöferl MW. L-Arginine restores splenocyte functions after trauma and hemorrhage potentially by improving splenic blood flow. *American Journal of Physiology*. 1999; 276:C145-C151.
71. Angele MK, Smail N, Wang P. L-arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma-hemorrhage. *Surgery*. 1998;124:394-402.
72. Laszlo F, Whittle BJR. Endogenous nitric oxide in the maintenance of rat microvascular integrity against widespread plasma leakage following abdominal laparotomy. *British Journal of Pharmacology*. 1999;126:515-521.
73. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetic. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57.
74. Bosman FT, Visser BC, Van Oeveren J: Apoptosis; Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996; 192:676-83.
75. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol*. 1992; 10:267-93.
76. Wyllie AH. Apoptosis. *Br Br J Cancer*. 1993; 67: 205-8.
77. Vaux DL, Strasser A The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1996; 93:2239-44.
78. Cotran RS, Kumar V, Collins T. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp; 1999.p18-25.
79. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med*. 2000;6:513-519.
80. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol*. 1998;60: 619-642.

81. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis; an overview of cell death .
Am J Pathol. 1995; 146:3-15.
82. Sobotka L. Immünonutrition. In: Basics in Clinical Nutrition.2004:179-180.
83. Sobotka L. Substrates Used In Parenteral and Enteral Nutrition.In: Basics in
Clinical Nutrition.2004:185-191.
84. Langkamp-Henken B, Glezer JA, Kudsk KA. Immünologic structure and
function of the gastrointestinal tract. NCP. 1992;7:100-8.
85. Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K. Immünobiology and immünopatology
of human gut mucosa: humoral immüinity and intraepitelial lymphocytes.
Gastroenterology. 1989;97:1562-84.
86. Li J, Gocinski B, Langkamp-Henken B et al. Effect of parenteral and enteral
nutrition on gut-associated lymphoid tissue. J Trauma .1995;39:44-52.
87. Nirgiotis JG, Andrassy RJ. Bacterial translocation. In: Borlase BC, Bell SJ,
Blackburn GL, Forse RA, editors. Enteral Nutrition: Chapman & Hall,1994:15-
24.
88. Sori A, Rush B, Lysz T et al. The gut as a source of sepsis following
hemorrhagic shock. Am J Surg. 1988;155:187-92.
89. Lally KP, Andrassy RJ, Foster JE et al. Evaluation of various nutritional
supplements in the prevention of stress-induced gastric ulcers in the rat. Surg
Gyn Obstet. 1984;158:124-7.
90. Smith RJ.Glutamine metabolism and its physiologic importance. J Parenter
Enter Nutr.1990; 14(4):40S-44S.
91. Bergstrom J, Furst P,Noree LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid
concentration in human muscle tissue. J Appl Physiol. 1974;36:693-7.
92. Ramadan ME, Greenberg DM. An enzymatic micromethod for determination
of glutamine and asparagine in blood. Anal Biochem. 1963;6:144-52.
93. Windmueller HG, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and
glutamate form the lumen as compared to glutamine form the blood. Arch
Biochem Biophys.1975;171:662-72.

94. Neu J, Shenoy V, Chakrabarti R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB J.* 1996;10:829-37.
95. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 1990; 48:297-309.
96. Krebs HA. Metabolism of amino-acids. IV. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J.* 1935;29:1951.
97. Abumrad NN, Williams P, Frexes –Steed, et al. Inter-organ metabolism of amino acids in vivo. *Diabetes Metab Rev.* 1989;5:213.
98. Souba WW, Austgen TR. Interorgan glutamine flow following surgery and infection. *JPEN.* 1990; 144(Supp) : 90-93.
99. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol.* 1985;473-489.
100. Hörig H, Spagnoli GC, Filgueira L, et al. Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation. *J Cell Biochem.* 1993;53:343.
101. Bussolati O, Uggeri J, Belletti S, et al. The stimulation of Na, K, Cl cotransport is a mechanism for cell volume increase during the cell cycle. *FASEB J.* 1996;10:920.
102. Juretic A, Spagnoli GC, Hörig H, et al. Glutamine requirements in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Clin Nutr.* 1994;13:42.
103. Robinson MK, Rodrick ML, Jacobs DO, et al. Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function. *Arch Surg.* 1993;128:29.
104. Spittler A, Oehler R, Götzinger P, et al. Low glutamine concentrations induce phenotypical and functional differentiation of U937 myelomonocytic cells. *J Nutr.* 1997; 127:2151.
105. Häussinger D, Lang F, Gerok W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol.* 1994; 267:E343.

106. Rhoads JM, Argenzo RA, Chen W, et al. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am Physiol*. 1997; 272:G943.
107. Mathews DE, Marano MA, Campbell RG. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. *Am J Physiol* .1993; 264:E848-E854.
108. Souba WW, Klimberg VS, Plumley DA, Salloun RM, Flynn TC, Bland KI, Copeland EM. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Research*. 1990;48:383-391.
109. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes in the rat. *Biochemical Journal*. 1983;212:835.
110. Deutz NEP, Reijnen PLM, Athanasas G, Soeters PB. Post-operative changes in hepatic, intestinal, splenic and muscle fluxes of aminoacids and ammonia in pigs. *Clinical Science*. 1992;83:607-614.
111. Kuhn KS, Stehle P, Furst P. Glutamine content of protein and peptide-based enteral products, *J Parenter Enter Nutr*.1996; 20(4):292-295.
112. Swails W, Bell SJ, Borlase BC, et al: Glutamine content of whole proteins: implications for enteral formulas. *NCP*.1992; 7:77-80.
113. Ziegler TR, Benfell K, Smith RJ, et al. Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. *J Parenter Enter Nutr*.1990; 14(4 suppl):137-146.
114. Grant JP, Snyder PJ. Use of L-glutamine in total parenteral nutrition. *J Surg Res*.1988; 44(5):506-513.
115. Klimberg VS, Nwokedi E, Hutchins LF et al. Glutamine facilitates chemotherapy while reducing toxicity. *J Parenter Enter Nutr*. 1992; 16(6): 83S-87S.
116. Houdijk AP, Visser JJ, Rijnsburger ER, Teerlink T. Dietary glutamine supplementation reduces plasma nitrate levels in rats. *Clin Nutr*. 1998;17:11-14.

117. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong RPY. Formation of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J. Physiol.* 1997; 272: H2327-2336.
118. Wu G, Haynes TE, Li H, Yan W, Meininger CJ. Glutamine metabolism to glucosamine is necessary for glutamine inhibition of endothelial nitric oxide synthesis. *Biochem J.* 2001;353: 225-245.
119. Meininger CJ, Wu G. L-Glutamine inhibits nitric oxide synthesis in bovine venular endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;281:448-453.
120. Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, Nair PN, Shertzer HG, Dibello P, Jacobsen DW. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J. Physiol.* 2001;280:C867-873.
121. Espat NJ, Watkins KT, Lind DS, Weis JK, Copeland EM, Souba WW. Dietary modulation of amino acid transport in rat and human liver. *J. Surg. Res.* 1996; 63: 263-268.
122. Hammarqvist F, Luo JL, Cotgreave IA, Andersson K, Wernerman J. Skeletal muscle glutathione is depleted in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 1997;25 :78-84.
123. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in ischemia/reperfusion injury in rat hind limb model, *Am. J. Surg.* 1999; 178:147-150.
124. Olalla L, Aledo JC, Bannenberg G, Marquez J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett.* 2001; 488 :116-122.
125. Wang XF, Cynader MS. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J. Neurochem.* 2000;74:1434-1442.
126. Amores MI-Sanchez. MA. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol. Genet. Metab.* 1999;67:100-105.
127. Chiueh CC, Rauhala P. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic. Res.* 1999; 31:641-650.

128. Nirgiotis JG, Hennessey PJ, Andrassy RJ. The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat. *J Pediatr Surg.*1991; 26:936-941.
129. Ziegler TR, Young LS. Therapeutic effects of specific nutrients. In: Rombeau , Caldwell MD, editors. *Enteral and tube feeding.* 3rd ed. Philadelphia:WB Saunders, 1997:112-137.
130. Furst P, Stehle P. Are we giving unbalanced amino acid solutions? From protein hydrolysates to tailored solutions. In: Wilmore DW, Carpentier YA, editors. *Metabolic support of the critically ill patient.* New York, Springer-Verlag. 1993. 119-136.
131. Daly JM, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Diyetrick-Gallagher M, Shou J, Ruggieri B. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patients. *Ann Surg* 1988; 208:512-523.
132. Ziegler TR, Leader I. Adjunctive recombinant human growth hormone therapy in nutrition support: potential to limit septic complications in ICU patients. *Semin Resp Infect.* 1994; 9: 240-247.
133. Barbul A, Rettura G, Levenson SM et al. Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. *Am J Clin Nutr.* 1983;37:786-794.
134. Alexander JW, Gottschlich MM. Nutritional immunomodulation in burn patients. *Crit Care Med.*1990; 18(2):S149-153.
135. Barbul A, Lazarow SA, Efrom DT, et al. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery.*1990; 108(2):331-337.
136. Rudolph FB. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J Nutr.* 1994;124:124-127.
137. Fanslow WC, Kulkarni AD, Van Buren CT, et al. Effect of nucleotide restriction and supplementation on resistance to experimental murine candidiasis. *J Parenter Enteral Nutr.*1988; 12(1):49-52.
138. Kulkarni AD, Rudolph FB, Van Buren CT. The role of dietary sources of nucleotides in immune function. a review. *J Nutr.* 1994;124:124-127.

139. Van Buren CT, Kulkarni AD, Schandle VB et al. The influence of dietary nucleotides on cell-mediated immunity. *Transplantation*. 1983; 36:350-352.
140. Carver JD, Cox WI, Barners LA. Dietary nucleotide effects upon murine naturel killer cell activity and macrophage activation. *JPEN*. 1990; 14: 18-22.
141. Carver JD. Dietary nucleotides: cellular immunity, intestinal and hepatic system effects. *J Nutr*. 1994;124(1 suppl):144-148.
142. Uauy R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr*. 1994; 124(1 suppl):157S-159S.
143. Rudolph FB. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J Nutr*. 1994;1.
144. Beale RJ, Byrg DJ, Bihari DJ. Immunonutrition in the critically ill: a systematic review of clinical outcome. *Crit Care Med*. 1999; 27(12):2799-2805.
145. Seidner DL. Clinical uses for omega-3 PUFA and structured triglycerides. *ClinSupport* 14e. 1994;16:7-10.
146. Mc Clave SA, Lowen CC, Snider HL. Immunonutrition and enteral hyperalimentation of critically ill patients. *Dig Dis*. 1992;37:1153-61.
147. Bagley JS, Wan JM-F, Georgleil M et al. Cellular nutrition in support of early multiple organ failure. *Chest*. 1991;100:1825-85.
148. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*. 1989;320:265-71.
149. Alexander JW, Saito H, Trocki O et al. The importance of lipid type in the diet after burn injury. *Ann Surg*. 1986;204:1-8.
150. Peck MD, Ogle CK, Alexander JW. Composition of fat in enteral diets can influence outcome in experimental peritonitis. *Ann Surg*. 1991;213:74-82.
151. Carpentier YA. Omega-3 fatty acids: from nutrition to pharmacological properties. *Clin Nutr*. 2001;20(S4):p6-7.
152. Peck MD. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: benefit or harm during sepsis. *New Horizons*. 1994;2:230-236.
153. Marmarou A, Foda MAA-E. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg*. 1994; 80:301-313.

154. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.
155. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34:497-50.
156. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut.* 1998; 42: 530-537.
157. Bowen ID. Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol Int.* 1993; 17: 365-80
158. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, Fujimoto K. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:649-658.
159. Brunner CS. Neurologic impairments. In: Matarese LE, Gottschlich MM editors. *Contemporary Nutrition Support Practice, A Clinical Guide.* St. Louis: Saunders; 2003. p.384-395.
160. Kearnes P. Nutrition in neurological injury. *Nutr Clin Pract.* 1991; 6(6):211-212.
161. Suchner U, Senfleben U, Eckart T, et al. Enteral versus parenteral nutrition: effects on gastrointestinal function and metabolism. *Nutrition.* 1996; 12(1):13-22.
162. Sacks G, Brown R, Teague D, et al. Early nutrition support modifies immune function in patients sustaining severe head injury. *J Parenter Enteral Nutr.* 1995; 19:387-392.

163. Houdijk APJ, Rijnsburger ER, Jansen J, et al. Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet*. 1998; 352:772-776.
164. Griffiths RD, Jones C, Palmer TEA. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine supplemented parenteral nutrition. *Nutrition*. 1997; 13:295-302.
165. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A Pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem pharmacol* 1989; 1709-1715.
166. Salzman NP, eagle Sebring ED. The utilization of glutamine, glutamic acid nad ammonia for the biosynthesis of nucleic acid bases mammalian cell cultres. *J Biol Chemistry*. 1958;230:1001-1013.
167. Y. Chen, P.H. Chan, R.A. Swanson. Astrocytes overexpressing Cu, Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia* .2001; 33:343-347.
168. Pratico D, Reis P, Tank LX, Sunk S, Rokach J, McIntosh TK. Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2002; 80:894-898.
169. Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg*. 1986; 64:803-807.
170. Kaynar MY, Erdinçler P, Türeci E, Sanuz GZ, Gürel N, Tütüncüler B. Deneysel kafa travmasında T lenfosit alt grup değişiklikleri. *Türk Rean Cem Mecmuası*. 1998;26:364-367.
171. McCormick WF. Pathology of closed head injury. In: Wilkins HR, Rengacharty SS, editors. *Neurosurgery*. Mc Graw Hill Book Co, 1985:1544-1570.
172. Teasdale GM, Graham DI. Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury fundamental problems. *Neurosurgery*. 1998; 43:723-738.
173. Chiles III BW, Cooper PR. Extra-axial hematomas. In: Loftus CM, editor. *Neurosurgical Emergencies Vol I-II*. First ed. Iowa: American Association of Neurological Surgeons, 1994: 73-100.

