

**RATLARDA DENEYSEL TRAVMATİK BEYİN HASARINDA,  
ALFA - TOKOFEROL'ÜN LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Z. Serdar ATAİZİ

2000

ESKİŞEHİR

## ÖZET

Oksijenin toksik etkilerinin bizzat oksijene değil, onun oluşturduğu serbest oksiradikallere bağlı olduğu gösterilmiştir. Santral sinir sistemi için toksik etkileri olan serbest oksiradikaller bir tür nörotoksindir. Bir takım fizyopatolojik olaylar; subaraknoid kanama, ödem, iskemi, hipertansiyon, iltihabi reaksiyon ve travmada bahsedilen reaktif oksijen radikalleri ve buna bağlı lipid peroksidasyon ürünleri oluşmaktadır.

Bu çalışmada, travmatik beyin hasarı sonucunda oluşan lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ve antioksidan savunma sistemlerinin göstergesi olan redükte glutatyon (GSH) ve glutatyon peroxidaz (GPx) değerleri ölçüldü. Güçlü bir antioksidan olan alfa – tokoferolün lipid peroksidasyonuna olan etkileri araştırıldı.

Travma, modifiye Feeney (ağırlık düşürerek açık kafa travması) modeli ile oluşturuldu. Deneyde 28 erkek Wistar rat kullanıldı. Ratlar 4 gruba ayrıldı. 1. gruba kraniotomi uygulandı, travma uygulanmadı. Sham grubu olarak kabul edildi. 2. gruba kraniotomi uygulandı ve ardından travma oluşturuldu. 3. gruba travmadan 8 saat önce intraperitoneal çözücü verildi ve kraniotomi uygulandı, travma oluşturuldu. 4. gruba yine travmadan 8 saat önce intraperitoneal alfa – tokoferol verildi ve kraniotomi uygulandı, travma oluşturuldu. Tüm gruplara deney bitiminden 12 saat sonra dekapitasyon işlemi uygulandı.

Her bir grupta lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve anti – oksidan savunma sistemlerinin göstergesi olan, GSH ve GPx düzeyleri çalışıldı. Travma

uygulanan grupta MDA değerleri, sham ve alfa – tokoferol uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek lld (P<0,05). GSH değerleri, alfa - tokoferol ve sham grubunda, travma ve üzücü uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek saptandı (P<0,05). Sham grubu ile alfa – tokoferol uygulanan grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (P>0.05). GPx ortalama değerlerinin, sham ve alfa – tokoferol uygulanan grupta daha yüksek olarak saptanmasına rağmen, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuçta, travmatize beyin dokusunda lipid peroksidasyon ürünü MDA değeri artarken, antioksidan savunma ürünü GSH azalmaktadır. Ancak antioksidan etkili alfa – tokoferol verilen travma grubunda MDA değerleri azalmış olarak, GSH değerleri de yükselmiş olarak bulunmuştur.

Buna göre yakın bir gelecekte kafa travması tedavisinde, anti – oksidan ajanlarla uygun tedavi modelleri oluşturulabileceği kanısındayız.

## GİRİŞ

Kafa travmaları ile ilgili ilk raporlar, M.Ö. 2800'lü yıllarda yaşayan Mısır'lı hekim İmhotep'e aittir. İmhotep'e ait olan ve bulunan papirüste yazılan 48 travma vakasının 15'i kafa ile ilgili olduğu ve burada kafa travmalarını anlattığı tespit edilmiştir. Daha sonraki araştırmalarda eski İnkâ İmparatorluğu mezarlarında kafa taşı incelemelerinde, kafadaki trepanasyonların başlangıçta batıl nedenlerle yapıldığı zannedilmiş ancak daha sonraki incelemelerde tedavi amaçlı yapıldığı düşünülmüştür.

Avrupada tedavi amaçlı ilk trepanasyonlar Hippocrates (M.Ö. 460 – 355) tarafından uygulanmış. İbn – i Sina, M.S. 9. yy.'da trepanasyonu önermiştir.16. yüzyılda Fransız Petit kommosyo, kontüzyo ve kompresyon ayırımını yapmıştır.

20. yüzyılın sonlarına doğru modern nörofizyoloji, nöroanotomi, nöropatoloji, nöroradyoloji, nöroanestezi ve nöroşirürji kafa travmasının daha iyi değerlendirilmesini ve en uygun tedavilerin yapılmasını sağlamışlardır.

Günümüz Türkiye'sinde kafanın travmatik hasarındaki ölümlerin %60'nın nedeni trafik kazalarıdır. Trafik kazalarından ölüm insidansı 100.000'de 10'dur. Erkekler iki kat fazla olup en sık 13 – 30 yaşları arasında görülmektedir. Trafik kazaları dışında; iş, ev ve spor kazaları diğer en sık nedenlerdir. Alkol alımı en sık hazırlayıcı nedenlerdendir. Sosyoekonomik düzeyi düşük ve kırsal yerleşim alanlarında en sık kafa travması nedeni ateşli silah yaralanmalarıdır (64).

Travmatik beyin hasarında etkiler, ani ve geriye dönüşümsüz mekanik olaylardan kaynaklanır (26). Kafa travması ile primer hücre hasarı yani asıl darbenin oluşturduğu hasar ve sekonder hücre hasarı olmak üzere iki tip hasar oluşmaktadır (45,64,74). Kafa travması sonrası gelişen primer ve sekonder hasarda serbest oksijen radikallerinin anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir. Bu radikaller nörotoksiktir (44).

Kafa travması ile oluşan primer hasarda, serebral hemisferler ve beyin sapındaki subkortikal beyaz cevhere ait sinir lifleri aksonlarında lokal veya diffüz harabiyet oluşmaktadır (82). Bu primer hasar; oksijen kaynaklı serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonun oluşumunu, eksitatör glutamat ve aspartat salınımını, kalsiyumun hücreye girişini, eikozonoidlerin oluşumunu sağlamakta, bu da hücre membran permeabilitesini bozarak sekonder hücre hasarına sebep olmaktadır (26,43,62). Bu reaktif oksijen radikalleri, travma haricinde iskemi, subaraknoid kanama, beyin ödemi gibi durumlarda eşlik etmektedirler (19,51).

Santral sinir sistemi hücre hasarı sonucunda, membran yapılarında mevcut olan kolesterol, gangliosid ve alfa – tokoferol'un yapısal ve fonksiyonel kaybı meydana gelmekte bu da peroksidatif hidrolizi başlatmakta ve sonuçta serbest oksijen radikali oluşumu meydana gelmektedir (41,86).

Hücre düzeyinde bu oksidatif hücre hasarından korunmak için katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri kullanan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Katalaz, serebral dokuda düşük oranda bulunmakta, SOD ve GPx'de orta düzeyde bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı beyin dokusu, serbest oksijen radikallerine çok daha duyarlıdır (19,43).

Primer hasarın önlenememesine karşın, morbidite ve mortalitenin azaltılabilmesi için sekonder hasarın tanınması ve tedavi edilmesi ile mümkün olmaktadır (43,79). Son zamanlarda serbest oksijen radikallerinin yapacağı hasarı azaltmak için tedaviler denenmektedir. Bu amaçla fosfolipaz inhibisyonu, serbest radikal bağlayıcıları, steroidler, gangliozidler ve antioksidanlar kullanılmaktadır. Bu zararlı etkilerin oluşmasını engellemek için farmakolojik stratejiler denenmektedir (26,44,62).

Yapılan çalışmalarda, alfa tokoferolün travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkileri görülmüştür. Son yıllarda tokoferol ve analogları, bir çok çalışmada iskemik nöronal hasarda alternatif tedavi metodu olarak kabul edilmiştir. Ancak bunun aksine, literatürlerde tokoferolün travmatik nöronal hasarda kullanıldığına dair az sayıda yayına rastlanmaktadır (44).

Bu çalışmamızda, travmatik beyin hasarında oluşan serbest oksijen radikalleri ile ilişkili lipid peroksidasyonuna karşı alfa tokoferolün koruyucu etkisi araştırıldı. Modifiye Feeney ağırlık düşürme metodu ile açık kafa travması modeli kullanılarak ratlarda lipid peroksidasyon son ürünü MDA ve antioksidan savunma mekanizmalarının göstergesi olan GSH ve GPx düzeyleri biyokimyasal olarak ölçüldü.

## SERBEST RADİKALLERİN TANIMI

Serbest radikaller son orbitalinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron bulunan ve birçok biyomolekül ile kimyasal reaksiyona giren moleküllerdir. Kimyasal olarak çok aktif reaksiyonlar oluştururlar, bu nedenle oluşumları ile reaksiyona girme zamanları arasındaki süre çok kısadır. 1899'da Smith tarafından farelerde  $O_2$ 'e bağlı olarak gelişen pulmoner hasar saptanmıştır. Canlı organizmasında en reaktif radikal, hidroksil radikalidir ( $OH^\bullet$ ). Hidroksil radikali, suya uygulanan yüksek enerjili radyasyon ile de oluşmaktadır. En basit radikal  $H^\bullet$  radikalidir. Zincirleme reaksiyonlar özellikle lipid peroksidasyonunda genellikle  $H^\bullet$ 'in diğer bir molekülle yer değişmesi ile başlamaktadır (56,69,81).

İnsan vücudunda meydana gelen başlıca serbest radikaller şunlardır:

1. Hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ): Radon ve kozmik radyasyon gibi düşük dalga boyundaki elektromanyetik radyasyon ile meydana gelmektedir.

2. Süperoksid radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) : Katekolaminler, tetrahidrofolatlar, mitokondriyel yapı elemanları gibi değişik birçok molekül ile  $O_2$ , süperoksid oluşturabilmektedir. Aktive olmuş makrofajlar tarafından yabancı mikroorganizmaların ortadan kaldırılması sırasında bu radikallerden, bol miktarda üretilmektedir. Solunum yolu ile alınan  $O_2$  in yaklaşık %1-3 kadarı, süperoksid radikali oluşumuna katılmaktadır.

3. Nitrik oksid radikali ( $NO^\bullet$ ): Fizyolojik bir serbest radikaldir. Vasküler endotel, immün sistem hücreleri, döşeyici epitel hücreleri ve nöron hücreleri

tarafından üretilmekte ve hücre içi ikinci haberci sisteminin bir elemanı olarak etki göstermektedir. Aşırı yapımı ya da prekürsörü olan maddelerin fazla alınması nedeni ile toksik etkileri oluşabilir (69). Süperoksid radikalının bol miktarda oluşması, NO•'in peroksinitrite dönüşümünü hızlandırır, dolayısı ile NO• aktivitesi azalmış olur.



Biyolojik dokularda serbest radikallerin 3 temel kaynağı vardır.

- a. Fizyolojik oksidatif metabolizma.
- b. Mikrozomal sitokrom P 450 enzim sistemi aktivitesi.
- c. Aktive olmuş makrofajların "respiratuar patlaması"(69).

Aşırı üretim ya da yetersiz detoksifikasyon nedeni ile serbest oksijen radikalleri tarafından bazı biyokimyasal olayların fonksiyonları engellenmektedir, örneğin:

1. Yapısal ve enzimatik özellikli protein yapılarda denatürasyon ve peptid bağlarında hasarlar oluşur.
2. Santral sinir sistemindeki nörotransmitter fonksiyonları bozulur.
3. Genomik yapıda önemli miktarlara ulaşan ve hücre harabiyetine hatta kansere neden olabilecek mutasyonlar oluşur.
4. Membran lipidlerinin peroksidasyonu ile hücre yapısında ve fonksiyonlarında önemli bozukluklar meydana gelir.



## FİZYOPATOLOJİ

Kranio serebral travmada, darbenin yaptığı primer hasar önlenemez. Bu primer beyin hasarında, travma lokalizasyonuna göre serebral damarlarda yırtılma sonucu belirgin veya mikroskobik kanamalar olur (64). Bu kanamalar, kontüzyon, laserasyon, hemorajik infarkt ve hematoma bağlı subpial ekstrasvazasyon sonucunda açığa çıkar. Lokal şişme ve vazojenik ödem oluşur. Temelde yatan patolojilerden birisi, eritrosit parçalanma ürünü hemoglobinin açığa çıkmasıdır. Hemoglobinden, demir ve hem serbestleşir. Oluşan demirde hidroksil serbest radikalının oluşumu için gerekli Haber – Weiss reaksiyonunu katalizler (43).

Travma; nöronal ve glial hücrelerde lokal veya diffüz harabiyete neden olabileceği gibi serebral hemodinamide de sapmalara neden olur. Primer olay daha sonra fizyopatolojik olaylar zincirini başlatır. Eksitator glutmat ve aspartat, reaktif oksijen ürünlerin oluşumu,  $Ca^{++}$  toksisitesi, hücre membran permeabilite kaybı ile sekonder beyin hasarına neden olacaktır (64).

Beyin hücrelerindeki travmatik hasarda nöronlara etki; beyinde lokal veya diffüz akson harabiyetini takiben, önce hücre cisminde şişme, Nissel cisimlerinde dağılma ve nükleusun çevresel yerleşimi ile belirlenen kromatolizis olur. Uygun şartlarda hücre tekrar iyileşebilir. Ancak akson ve çevresinin tam hasarında akson ve myelin parçalanır. Takiben mikroglial yıldızları yapan hücre grupları ve demyelinizasyon ve de gliozis görülür (46,64).

Glial hücrelere etki; harap olan nörondan ekstrasellüler mesafeye gelen  $K^+$  ve  $K^+$ 'a bağlı nörotransmitterlerin salınımı sonucu glial şişme olur. Travmatik

zedelenme, reaktif gliozisi uyarır. Çünkü, glial hücreler pH ve eksitator aminoasit seviyelerinin düzenlenmesinde dahil olduğu önemli hemostatik role sahiptirler. Glial hücrelerde post travmatik değişiklikler, hem doku asidozisine hem de eksitoksisitesine yardımcı olabilmektedirler (46).

Reaktif astrositler, proteolitik enzimler gibi çeşitli oksidatif enzimlerin miktarında artışa neden olurlar. Travma; kan akımında, glukoz ve oksijen kullanımında azalmalara neden olacaktır (11,14,46).

Serbest oksijen radikalleri, direkt olarak proteinleride etkileyebilir. Örneğin; astrositlerde fazla miktarda bulunan glutamin sentetaz enzimi serbest radikallere oldukça duyarlıdır. Bu enzim, astrositlerde nöroaktif glutamatın ve toksik amonyağın glutamine çevrilmesinde önemlidir. Bu enzimin inhibisyonu beyinde invitro, extrasellüler glutamatın ve amonyağın daha yüksek seviyelere çıkmasına neden olacaktır (41).

Beyin travmatik hasarları primer ve sekonder mekanizmalara göre doku hasarına neden olurlar. Son çalışmalar hasarlanmış beyin dokusunda reaktif oksijen ürünlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun nöronal dejenerasyonu artırdığı gösterilmiştir (43,44).

## **TRAVMATİK BEYİN HASARINDA SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU VE ETKİLERİ**

Travmatik beyin hasarı, primer ve sekonder mekanizmalar sonucu doku hasarına neden olur. Genellikle hasarın, vasküler ve nöronal dejenerasyona sebep olan bir seri moleküler olayın sonucunda olduğuna inanılır (82).

Oluşan serbest oksijen radikalleri, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, permeabilitenin artmasına, emzimlerin ve sitostrüktürel proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmasına, antiproteazların inhibisyonu sonucu, proteolitik enzimlerin aktivasyonuna DNA yapısının bozulmasına ve kısalmasına, ayrıca mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olurlar. Ayrıca proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinde de oksidatif zedelenme yaparlar (45).

Sekonder zarar verici etkiler fosfolipid hidroliz ürünleri nöropeptidler monoaminler ve aminoasitlerdeki değişiklikler membran hasarına ve hücre ölümüne neden olurlar (42,86). Travmadan sonraki en erken değişiklik, fosfolipaz aktivasyonu ve lipid peroksidasyonu ile ilgili olanlardır (29). Hücre membranındaki mekanik hasar zedelenmenin erken döneminde çokludoymamış yağ asitlerinin (PUFA) salıverilmesine neden olmaktadır (63).

Fosfolipidlerin, trombosit agregan faktörün, serbest yağ asitlerin salıverilmesine neden olan fosfolipazla beraber kininojen aktivasyonu, membran yapısını oluşturan maddelerin yapısal ve fonksiyonel kaybı ile beraber peroksidatif hasarın başlamasına neden olur (41). Bu, lipid ve bioenerjik

değişiklikler,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  akışı ile ilgili iyonik hemostazı ciddi şekilde etkileyebilirler (77,87).

Özellikle travmadan sondaki dönemde glutamat ve aspartat gibi eksitatör aminoasitlerin oranında belirgin bir artış saptanmıştır. Bu aminoasitler, hem *invivo* hem *invitro* N – metil – D – aspartat reseptörleri, quinata reseptörleri ve  $\infty$  – amino – 3 hidroksi – 5 – metilsoxale – 4 propienat reseptörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu reseptörlerin aktivasyonu intrasellüler  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Na}^+$  seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (18,57,63). Artan hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$ , proteazların ve endonükleazların uyarılmasına bu da hücre ölümüne neden olmaktadır (52,63).

Serbest oksijen radikali üretimi  $\text{O}_2$  ve  $\text{Fe}^{+3}$  varlığında dokuda şiddetlenecektir. İnsan beyin dokusunda  $\text{Fe}^{+3}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  yüksek miktarlarda bulunur. Bunlar, serbest oksijen radikali oluşumunu kolaylaştıran elementlerdir. En aktif radikal olarak kabul edilen hidroksil radikali, demirin katalizlediği Haber – Weiss reaksiyonu tarafınca oluşturulur (4,22,43,51).

PUFA, özelliklede araşidonik asit ve onun metabolitleri doku hasarına neden olma yeteneğindedirler (63). Bu metabolitler, prostoglandinler ve lökotrienlerdir (61,63).

Travmadan saatler sonra inflamatuvar ve immun yanıt başlar ve günlerce sürer. Bu dönemde prostoglandinler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör, kinin gibi inflamatuvar mediatörler salınırlar (30). TAF kısmen fosfolipaz  $\text{A}_2$ 'nin aktivasyonu yoluyla üretilir ve postravmatik iskemiye yardım edebilir (89).

Oluşan serbest radikaller, beynin primer hasarı ile başlatılan inflamatuvar yanıtın şiddetinin artmasına ve yanıtın süresinin uzamasına aracılık etmektedir(80). Reaktif oksijen radikalleri, kan beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerini hasara uğrattırlar. Beyin ödemi, nöronal – glial hücrelerde yapısal değişikliklere neden olarak beyine direkt zarar verirler (85).



## SEREBRAL TRAVMADA ARAŞIDONİK ASİT METABOLİZMA ÜRÜNLERİ VE ETKİLERİ

Araşidonik asit metabolizması, reaktif oksijen ürünlerinin önemli bir kaynağıdır. Araşidonik asit bir yağ asitidir. Prostaglandinlerin ve lökotrienlerin prekürsörü vazoaktif bir maddedir. Hücre membran hasarı ile araşidonik asit salınımı artmaktadır (6,7,75,78).

Araşidonik asit; siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerince prostaglandin, prostasiklin, tromboksan ve lökotrienler gibi bir çok vazoaktif maddeye metabolize edilirler (34). Siklooksijenaz, iki oksijen molekülünün bir doymamış yağ asidine eklenmesini katalize eder. Bu enzimin ürünleri prostaglandinler, tromboksan A<sub>2</sub> ve B<sub>2</sub>'dir. İlk üretilen prostaglandin, PGG<sub>2</sub>'dir. Bu da hızla PGH<sub>2</sub>'ye dönüşür. PGG<sub>2</sub>'nin üretimi sırasında salınan süperoksit radikali, lipid peroksidasyonu sırasında ferritinden demirin salınmasını sağlar(42,45,50).

Serebral doku, siklooksijenaz için substrat olan P-450 epoksijenaz metabolitlerini yapabilme kapasitesine sahiptir. Böylece araşidonik asitin direkt metabolizması ve P - 450 metabolitlerinin metabolizması oksijen serbest radikalini oluşturabilir (50).

Diğer araşidonik asit metaboliti lökotrienler, lipooksijenaz ürünüdürler. Hidroksil radikali üretiminden sorumlu tutulmaktalar (43,45).

Lökotrienlerin, kan beyin bariyeri bozukluklarında potansiyel mediyatör olarak bilinmektedir. Bir çok çalışma, lökotrienlerin travmatik hasarı takiben

beyin ödemeine aracılık edebileceklerini bildirmektedir (9). Mekanik hasarın, direkt astrositlerden lökotrien salınımını uyarabileceğini ortaya koymuştur. Lökotrienler, kan beyin bariyerine olan etkilerini; vazomotor reaksiyonu direkt olarak etkileyerek, lökotrienleri aktive ederek, lökositlerin endotele yapışmasını arttırarak veya direkt endotel permeabilitesini arttırarak gerçekleştirirler. Böylece KBB'deki endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar açılmakta ve ödem oluşumu gerçekleşmektedir. Lökotrienlerden, LTC<sub>4</sub> ve LTD<sub>4</sub> serebral arteriollerde vazokonstrüksiyona neden olurlar (9,75).

## POST TRAVMATİK ÖDEM VE İSKEMİ

Klinik olarak travmatik beyin ödemi, vital beyin bölgelerine ve beyin sapına artmış intrakranial basınç olarak yansır ve bu bölgelerde sekonder kompresyon hasarına neden olur (43). Ödem, SSS'nin travma, tümör, iskemi, infeksiyon gibi klinik olaylara karşı verdiği bir yanıttır. Bu beyin lezyonlarına maruz kalan hastalarda ödem, mortalite ve morbiditenin asıl nedenidir (85).

Fosfolipidler, tüm biomembranların asıl yapı taşıdır (85). Fiziksel kompresyon veya soğukla oluşturulan zedelenmelerde, ödematöz beyinde fosfolipidlerin miktarında azalma olmaktadır. Deneysel fokal beyin kompresyonlarında görülen epidural hematomda, kompresyon kaldırıldığında vazojenik ödem gelişimi saptandı (86). Vazojenik ödem, artmış vasküler permeabilite, interstisiyel alana sıvı sızması ve sıvı retansiyonu ile olur. Permeabilite artımında lökotrienler ve oksijen serbest radikallerinin yanında histamin, serotonin ve bradikinin gibi mediatörlerde rol oynamaktadır (15). Biomembran bütünlüğü iyon transportu, sıvı dengelerinin transportu ve farklı maddelerin transportu için gereklidir. Permeabilite bozukluğu, ekstrasellüler  $Ca^{+2}$ 'un hücre içine girmesiyle hücre ölümüne kadar devam eden olaylar zincirini başlatır (85).

Beyin dolaşımının ani kesilmesi, zaman bağımlı olarak, yapısal metabolik ve fonksiyonel bozukluklara neden olur. Post iskemik durumun seyrini etkileyen primer faktörler, iskemi sırasında oluşan metabolik ve yapısal bozukluğun progresyonudur (84). Bundan dolayı iskemik sürenin kısa olduğu durumlarda beyin fonksiyonlarının geri dönüşümü daha kolay olmaktadır. Travmatik beyin hasarından sonra oluşan iskemi, kan damarlarında oluşan vazokonstrüksiyona



bağlıdır (82). İskemi sıklıkla fokaldır. Travmatik beyin hasarında glukozun anaerobik kullanımı serebral asidozis ile sonlanır (58).

Vazokonstrüksiyona bağlı, kapillerlerden nörona oksijen diffüzyonu azalır. Serebral perfüzyonun 10 – 22 ml/100gr/dk. altına düştüğünde iskemik dokuda biyokimyasal hasarlar başlar (64). Oksijen eksikliği, oksidatif fosforilasyonu durdurur. Glukoz azalması aspartat ve glutamatın artmasına, hücre içi CO<sub>2</sub> ve H<sup>+</sup> iyonlarının toplanmasına ve hücre içi ATP azalmasına neden olur. Enerji kaybının fazla olması, fosfolipid sentezini engellediği için iskemi boyunca serbest yağ asidi birikimi olacaktır. Eğer bu arada reperfüzyon gerçekleşirse, beyin dokusuna sağlanan oksijen ile serbest araşidonik asidin bir kısmı enzimatik peroksidasyona girer. Bu da göstermiştir ki siklooksijenaz ürünleri doku seviyeleri iskemi sırasında değil resirkülasyon sırasında belirgin derecede artmıştır. Yine aynı şekilde lipooksijenaz ürünleride reperfüzyon sırasında önemli derecede artmıştır. Bu peroksidasyon ürünleri kan damarlarındaki permeabilityi değiştirerek yan etkilerini oluşturdukları gösterilmiştir (84).

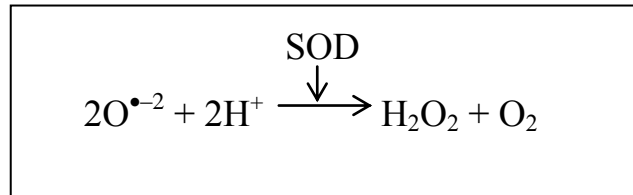
## ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Organizmanın yaşayabilmesi için oksijen mutlak gerekli bir maddedir. Oksijen bulunduğu ortamlarda, reaktif oksijen ürünleri oluşmaktadır. Herhangi bir patolojik yada non – patolojik süreç içinde serbest radikal aktivitesi bulunmaktadır. (Yaşlılık, Enflamasyon, Ateroskleroz, Kanser ve Travma gibi) Bazı mikroorganizmalara karşı bireyin immün sistemi içinde hayati rol oynamaktadır. Ayrıca detoksifikasyon reaksiyonlarında da anti – oksidan savunma sistemleri görev alırlar. Antioksidan savunma sistemleri tükenince o zaman hücre içi sitotoksik radikal etkinliği artar.

Normal şartlar altında dokular, serbest radikal hasarında enzimatik ve non – enzimatik savunma sistemleriyle korunmaktadırlar.

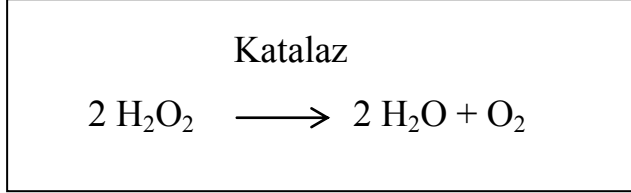
### A. Enzimatik Antioksidan Savunma

**1. Süperoksid dismutaz (SOD):** Bütün aerobik hücrelerde vardır. Antioksidan savunmanın ilk basamağıdır. Süperoksiti,  $H_2O_2$ 'e dismutasyonunu sağlar. Oksijen kullanımı fazla olan dokularda, SOD aktivitesi daha fazladır. Molekül ağırlığı 31.000 olması nedeniyle KBB'i geçemez. Biyolojik yarılanma ömrü 6 dakika olduğu için klinik kullanımı sınırlıdır (43,44).

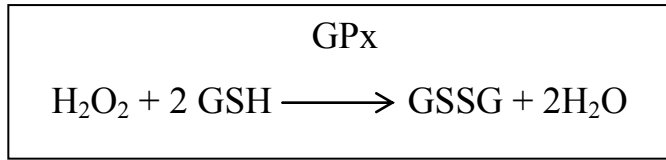


**2. Katalaz:** 4 Hem grubu içeren bir hemoproteindir. Demir çekirdeği içeren bir enzimdir.  $H_2O_2$ 'nin oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda.

Katalitik reaksiyonla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya dönüştürüp temizler. Beyin dokusu katalaz aktivitesi bakımından fakirdir (43).



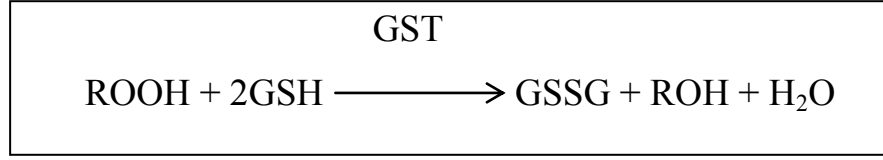
**3. Glutasyon Peroksidaz (GPx):** Selenyum elementi içerir. Eritrositlerde en etkili antioksidandır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini katalizler. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin – E yetersizliğinde fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGPx) membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (1). GPx, beyinde orta düzeyde bulunur (43).



**4. Glutasyon redüktaz (GSSG – R):** Glutasyon redüktaz, okside glutasyon (GSSG) ve NADPH arasındaki reaksiyonu katalizler (36). Ko faktörü, riboflavindir. Eksikliğinde, GSH rejenerasyonu bozular.



**5. Glutasyon S transferaz (GST):** Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere, lipid peroksitlerine karşı selenyum bağımsız GPx gibi aktivasyon gösteren bir antioksidandır.



## B. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma

**1. Lipid faz (membran):**  $\alpha$  – tokoferol,  $\beta$  karoten. Hücre membranları ve plazma lipoproteinleri yağda çözünen bir molekül olan  $\alpha$  – tokoferole sahiptir.

**2. Sıvı faz (non – membran):** Askorbik asit (c – vit) ürat, sistein, albümin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, GSH (Redükte glutatyon)’u sayabiliriz.

**Redükte glutatyon (GSH):** Çok önemli bir antioksidan olan redükte glutatyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif strese karşı korur. Hemen hemen tüm hücrelerde bulunur. Yapısında glutamik asit, sistein ve glisin bulunur. Hemoglobinin oksitlenerek, methemoglobine dönüşümünü önlemede rol alır. Hidrojen peroksit ve organik peroksidazları parçalayan glutatyon peroksidaz enzimi için supstrat işlevi görür.

**3. Eser elementler:** Zn, Se, Mn, Cu.

**4. Flavanoidler:** Lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerdir.  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{N}_3^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{LOO}^\bullet$  ile reaksiyona girer ve bu radikalleri temizlerler (45).

**5. Riboflavin:** Glutatyon redüktaz enzimi için ko faktördür.

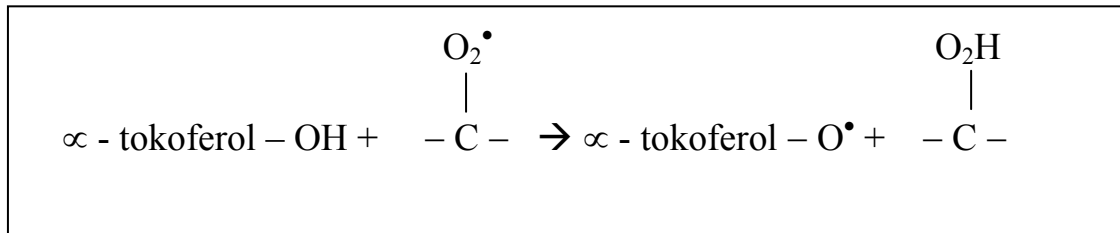
**6. Melatonin**

**7. Diyet kaynaklı diğerleri:** Glukoz, mannitol

## ALFA – TOKOFEROL (VİTAMİN – E)

Lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonlarını kıran antioksidan savunmanın en önemli komponenti, alfa – tokoferoldür. Hücre membranları ve plazma lipoproteinleri, yağda çözünen bir molekül olan  $\alpha$  – tokoferole sahiptir. Membrandan zengin, mitokondri ve mikrozomlar gibi hücre fraksiyonlarında yüksek düzeyde bulunur. Vitamin – E, alfa, beta, gamma ve delta tokoferoller ile tokotrienollerden oluşan 8 ayrı maddenin grup adıdır. Bunlardan alfa – tokoferol özellikle de doğal olarak oluşan d – alfa – tokoferol en yüksek biyolojik aktiviteye sahiptir (1,8,67).

Esansiyel ve yağda eriyen hidrofobik bir vitamin olan alfa – tokoferol etkisini; yapısına bağlı olan bir – OH grubu aracılığı ile gösterir. Bunun hidrojen atomu kolaylıkla ayrılır. Böylece lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksil ve alloksil radikalleri bir yağ asidi yan zinciri yerine bu antioksidan ile reaksiyona girer. Oluşan  $\alpha$  – tokoferol – O<sup>•</sup>'nin reaktivitesi zayıftır ve yağ asidi yan zincirine saldıramaz ve sonuç olarak zincir reaksiyonu durdurulmuş olur. Vitamin – E radikali, Vitamin – C tarafından tekrar Vitamin – E'ye indirgenir (68).



İnsanda, ciddi E – vitamini eksikliğinde önde gelen nöromusküler anamolilerin başında spinoserebellar ataksi ve myopati gelmektedir (71).

Eksikliğinde, sinirlerde ve sensorial nöronlarda serbest radikallerin oluşturduğu hasar nedeniyle periferik nöropatiye benzer bir durum meydana gelmektedir (73). İnsanda vitamin – E eksikliği nadir olarak meydana gelir. Ailesel isole vitamin – E eksikliği olan hastalar ( $\alpha$  – TTP gen defekti), azalmış plazma vitamin – E seviyelerine ve nörolojik bozukluklarla karakterize klinik tabloya sahiptirler. bu tabloda, serebellar ataksi, disartri derin tendon reflekslerinde kayıp, vibrasyon ve proprioseptif derin duyu kaybı ve Babinski pozitifliği mevcuttur (31,59).

Vitamin – E eksikliği, trombosit fonksiyonlarında bozukluklar yaratarak intraserebral hemorajilere sebep olduğu düşünülmektedir. Hücre düzeyindeki veya hayvan çalışmalarının vitamin – E'nin trombosit kümelenmelerini azalttığı ve trombosit kümelenmelerini arttıran prostaglandin yapımını da inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca trombosit agregasyonunu baskılayan bir madde olan prostasiklin yapımını arttırdığı bilinmektedir (72). Bunun dışında, vitamin – E tardif diskinezi gibi nöropsikiyatrik hastalıkların tedavilerinde de verilmektedir (12).

E vitamini, barsaklardan emilir. Lenfatik sisteme alınır ve şilomikronların bir komponenti olarak kana geçer. Kanda, LDL şeklindedir. Yüksek düzeyde görüldüğü dokular sırasıyla çoktan aza doğru adipoz doku, hipofiz, adrenal, testis, trombositler, kalp, kas, karaciğer, plazma, böbrek ve eritrositlerdir.

Bitkisel yağlardan özellik soya fasülyesi, ay çiçek ve mısır yağında, fındık ve ay çiçek tohumları en zengin kaynakları oluştururken, tahıllarda da E vitamini yüksek konsantrasyonlardadır.

Plazmada 0,5 mg/dl'den az olan bireylerde E vitamini eksikliği söz konusudur. Günlük diyetle 10 – 30 mg E vitamini alınımı serum düzeylerini normal değerlerde tutar. İyi beslenen her şahısta plazma E vitamini düzeyi 1 mg/dl civarındadır (13).





## ÇÖZÜCÜ VE İLAÇ HAZIRLANMASI

E vitamini yağda eriyen bir vitamin olduğu için sıvı yağların hepsinde çeşitli oranlarda bulunmaktadır. Susam yağı, E vitaminin en düşük miktarda olduğu bir sıvı yağdır. Bu nedenle E vitamini susam yağında yok kabul edildi ve havaları alınan kapaklı cam şişelerde hazırlan ve sterilize edilen susam yağı çözücü olarak kullanıldı.

$\infty$  – tokoferol T – 3251 25gr (SIGMA) katoloğu aracılığı ile özel ambalajda steril temin edildi. Denek başına 100 mg/kg intraperitoneal verilecek (44) şekilde 1cc susam yağı içerisinde 100 mg  $\infty$  – tokoferol olacak şekilde farmakoloji laboratuvarında hassas terazide hazırlandı. Hazırlanan ilaç taze şekilde ışığa maruz kalmadan kullanıldı.

## ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmamızda ağırlıkları 270 – 330 gram arasında olan toplam 28 adet wistar türü erkek ratlar kullanıldı. Ratlar, fakültemiz TICAM hayvan laboratuvarından temin edildi. Serbest yeme ve içmeye bırakılan ratlar, ilk grupta 6 diğer gruplarda 7'şer olmak üzere gruplara ayrıldılar. Çözücü ve alfa tokoferol gruplarına cerrahi işlemden ve travmadan 8 saat önce intraperitoneal enjeksiyonları yapıldı. Ratlara 50 – 60 mg/kg ketamin hidroklorid, 10 – 12 mg/kg xylazin hidroklorid anestezisi uygulandı. Sekresyon inhibisyonu amacıyla 0,1 mg/kg atropin sülfat intraperitoneal olarak verildi. Anesteziyi takiben ratlar 6F angio kateteri ile endotrakeal entübe edildi. %70 O<sub>2</sub> ve %30 atmosfer havası ve tidal volum 2 ml olacak şekilde ventile edildiler.

Ventilasyonu takiben, intrakardiyak olarak sol kalpten alınan kan ile kangazı ölçümleri yapıldı ve PaCO<sub>2</sub> 35 – 45 mm Hg, PaO<sub>2</sub> – 100 mmHg'nin üzerinde olacak şekilde solunum sayıları kontrol altına alındı. Vücut ısıları, rectal probe kullanılarak 36,5 – 37,5 °C arasında tutularak cerrahi işlemlere devam edildi. Tüm işlemler, steril cerrahi aletler aracılığı ile betadin syrp, steril eldiven, maske kullanılarak yapıldı.

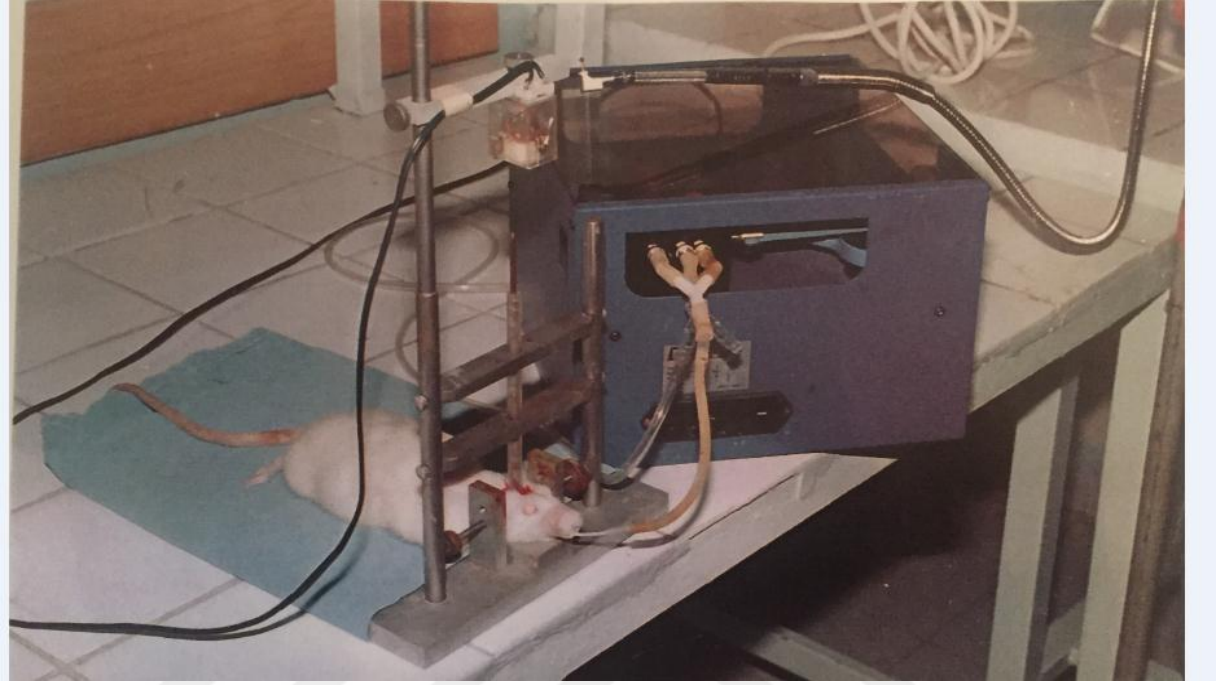
Ratlara Modifiye Feeney metodu kullanılarak ağırlık düşürmek suretiyle açık beyin hasarı oluşturuldu (49). Deneyde, prone konumda baş her iki taraftan çivilerle fikse edildi. (Resim- 1) Gerekli sahada bölge temizliği yapıldı. Steril şartlarda, skalp vertikal insizyon ile açıldı. Takiben cilt iki yana devrildi. Periostal doku sıyrıldı, yüksek devirli dental drill ve ince uçlu klemp yardımıyla saggital sütür ve coronal sütürler rehber alınarak sağ parietal kemiğe 1x0,5 cm boyutlarında kraniektomi yapıldı. Kraniektomi sırasında durayı zedelememeye

özen gösterildi. Kraniektomi sahasına, duraya dik olacak şekilde 12,5 cm uzunluğunda 3,5 mm iç çapında olan plastik yarı saydam tüp yerleştirildi. Bu rehber tüp içinde yine kraniektomi sahasına dik olacak şekilde 15,2 cm uzunluğunda 3,5 mm çapında ve 10 gram ağırlığındaki pirinç çubuk yukarıdan elektrik rolesine tespitli halde 5 cm yüksekten devre kesilerek kraniektomi sahası üzerine düşürüldü. (Travma şiddeti = ağırlık x yükseklik) Lezyon oluşturuldu. (Resim – 2) Takiben anatomik katlar kapatıldı. Travmadan 12 saat sonra ratlar yine aynı anestezi ile uyutuldu. Supine pozisyonda, torakotomi yapıldı. Sağ kalp aurikulası kesildi. Sol ventrikülden 10 cm H<sub>2</sub>O basınç altında 100 cc serum fizyolojik verilerek perfüzyon yapıldı. Beyin dokusu kandan temizlendi. Takiben ratlar dekapite edildi. Kraniumdan, beyin dokusu çıkarıldı. Sağ parietal korteksteki kontüzyone saha görüldü. (Resim – 4) Sağ hemisfer korteksleri, amigdala ve hipokampal giristan disseksiyon ile ayrıldı. Alınan sağ hemisferik korteks yapıları sıvı nitrojen ile dondurularak – 70°C’de saklandılar.

Birinci grup, sham grubu kabul edildi ve travma yapılmadan sadece kraniektomi yapıldı. İkinci grup, travma grubu kabul edildi. Kraniektomi ve travma oluşturuldu. Bu grup, uyguladığımız travma metoduna sekonder oluşacak serbest oksijen radikal ve lipid peroksidasyon ürünlerini göstermek amacıyla yapıldı. Üçüncü grup, çözücü grubu kabul edildi. Travmadan 8 saat önce çözücü olarak kullandığımız susam yağı steril olarak intraperitoneal verildi. Çözücü etkinliği araştırıldı. Dördüncü grupta alfa tokoferol (vitamin E) grubu kabul edildi.

Alfa tokoferol, beyin hücre membranına girebilmesi için belirli bir süreye ihtiyaç gösterir. 8 saat bu süre için yeterlidir (44). Bu nedenle travmadan 8 saat önce intraperitoneal olarak alfa tokoferol ratlara verildi ve ilacın etkinliği araştırıldı.

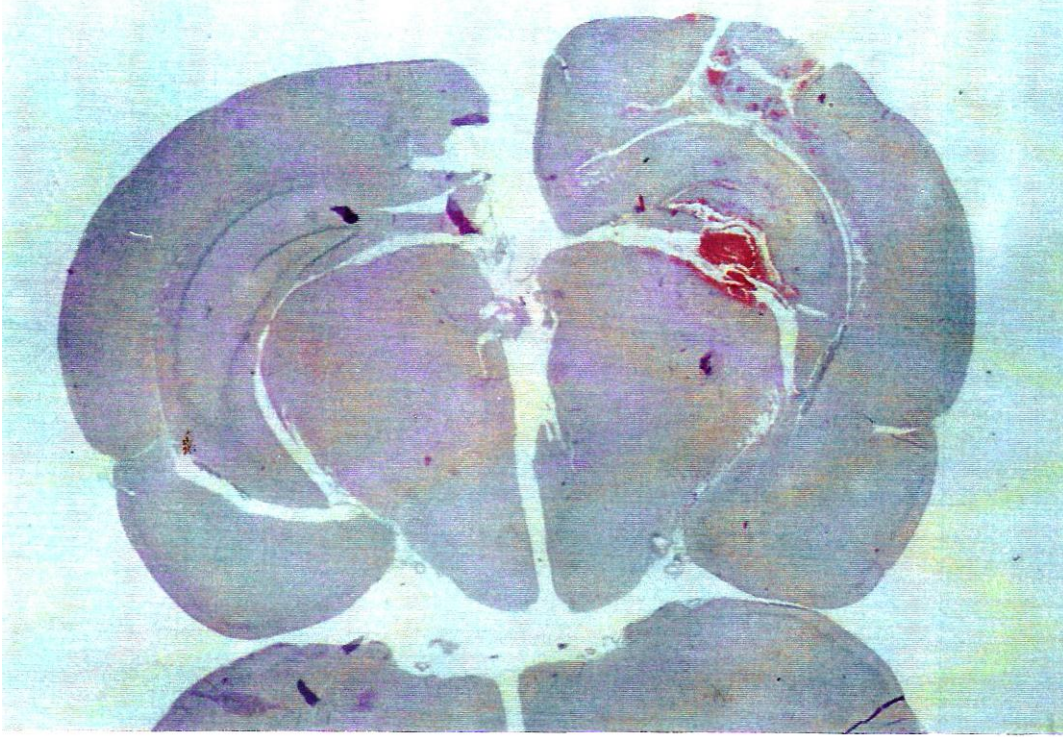
Travma uygulanan bir rata dekapitasyon işlemi uygulandı. Travma bölgesinden alınan lezyonlu kısım koronal kesitlerde hemotoksilen – eozin ile boyanarak travmanın yaptığı histopatolojik lezyon gösterildi. (Resim – 3)



Resim 1: Modifiye Feeney metodunun düzeneği yukarıda gösterilmiştir.



Resim 2: Ratta sağ parietal kortekse 50 gr'lık kuvvet uygulandıktan sonra oluşan lezyon.



Resim 3: Oluşan beyin lezyonundan alınan koronal kesitlerin hemotoksilen – eozin ile boyandıktan sonraki görünümü. Parietal korteks, hipokampus ve thalamusta hemorojik kontüzyon görülmektedir. İntraparankimal ve intraventriküler hemoraji oluşmuştur.



Resim 4: Travmatik beyin hasarından 12 saat sonra dekapite edilen ratın beyinde oluşan kontüzyonun makroskopik görünümü (Lezyon hemorojik korteksten derine doğru ilerlemiş görünüyor.)

## BULGULAR

Travma öncesi sol kalpten alınan kan gazı ortalama değerleri tablo halinde aşağıda gösterilmiştir.

Grubu	Sham n : 6	Travma n : 7	Çözücü n : 7	Alfa-tokoferol n : 7
PCO <sub>2</sub>				
Ortalama	40,18	38,8	39,54	40,22
± St. Sapma	± 3,26	± 2,12	± 3,72	± 3,71
PO <sub>2</sub>				
Ortalama	111,7	131,93	138,82	140,15
± St. Sapma	± 22,43	± 24,38	± 21,83	± 25,68

Tablo – Ortalama kan gazı değerleri (mmHg)

Kan gazı değerleri PCO<sub>2</sub> 35 – 45 mmHg arası, PO<sub>2</sub> da 100 mmHg'nin üzerinde olacak şekilde solunum sayısı ayarlandı.

Travma sonrası 12. saatte dekapite edilen ratların beyin dokuları homojenize edildikten sonra Tiyobarbiturik asit yöntemi (Ohkawa metodu) ile biyokimya laboratuvarında test edildi ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.



Grubu	Sham n : 6	Travma n : 6	Çözücü n : 6	Alfa–tokoferol n : 6
Ortalama	1,72	2,83	2,84	1,70
± St. Sapma	± 0,10	± 0,27	± 0,16	± 0,21

Tablo – MDA ortalama değerleri (nmol / mg protein)

Travmatik beyin hasarı oluşturulan ratlarda, gruplara göre ortalama MDA değerleri; sham grubunda  $1,72 \pm 0,10$ , travma grubunda  $2,83 \pm 0,27$ , çözücü grubunda  $2,84 \pm 0,16$ , alfa – tokoferol grubunda  $1,70 \pm 0,21$  olarak ölçüldü. Buna göre beyin dokusu MDA değerleri arasında en düşük ortalama değerin alfa – tokoferol grubunda olduğu görüldü.

MDA değerlerinin tek yönlü varyans analizi (Tukey – B) ile yapılan istatistiksel analizinde; travma grubunun MDA değerleri, sham ve alfa – tokoferol grubundan anlamlı olarak yüksekti. ( $p < 0,05$ ) zc grubunun ortalama değerleri, travma grubundan yüksekti fakat istatistiksel bir fark bulunmadı. ( $p > 0,05$ ) Alfa – tokoferol verilen grubun ortalama değerleri, sham grubundan düşük olarak saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ( $p > 0,05$ )

Ratlarda oluşturulan deneysel travmatik beyin hasarında, beyin dokularında llen GSH seviyeleri; sham grubunda  $72,96 \pm 2,97$ , travma grubunda  $46,88 \pm 4,36$ , çözücü grubunda  $48,71 \pm 3,48$ , alfa – tokoferol grubunda  $63,43 \pm 4,97$  olarak ölçüldü. Hem travma grubunda hemde çözücü grubunda antioksidan savunma sistem göstergelerinden GSH seviyesi, sham ve alfa –

tokoferol grubundan istatistiksel olarak düşük bulundu. ( $p<0,05$ ) Sham ve alfa – tokoferol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Grubu	Sham n : 6	Travma n : 6	Çözücü n : 6	Alfa–tokoferol n : 6
Ortalama	72,96	46,88	48,71	63,43
± St. Sapma	± 2,97	± 4,36	± 3,48	± 4,97

Tablo – GSH ortalama değerleri (ng / mg protein)

Deneysel travmatik beyin hasarında ratlarda ölçülen GPx değerleri; sham grubunda  $22,08 \pm 3,02$ , travma grubunda  $15,13 \pm 2,26$ , çözücü grubunda  $16,13 \pm 0,98$ , alfa – tokoferol grubunda  $20,58 \pm 1,14$  olarak bulundu. Sham grubu ile alfa – tokoferol gruplarında ortalama GPx seviyeleri yüksek olmasına karşın gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Grubu	Sham n : 6	Travma n : 6	Çözücü n : 6	Alfa–tokoferol n : 6
Ortalama	22,08	15,13	16,13	20,58
± St. Sapma	± 3,02	± 2,26	± 0,98	± 1,14

Tablo – GPx ortalama değerleri (ü / mg protein)

## TARTIŞMA

Ortamda oksijen konsantrasyonu normalin üstündeysen, aerobik canlılarda toksik etkilere yol açtığını ve bu toksik etkininde oksijenden değil de oksijen kaynaklı serbest oksijen radikallerinden kaynaklandığını ilk kez 1954 yılında Gershman ve Gilbert ifade etmişlerdir (38).

Süperoksid radikali, hidrojen peroksid ve hidroksil radikali gibi oksijen serbest radikalleri SSS'ne toksik etkilidirler. Başka bir deyişle nörotoksiktirler(20).

Kafa travmasından sonra görülen nöronal hasar, hem primer hemde sekonder mekanizmaların ikisiylede oluşur. Son çalışmalar, hasarlanmış beyin dokusunda oluşan serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonunun nöronal dejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir (41,43).

Sellüler membran düzeyinde lipid peroksidasyonu, membran fosfolipidlerinin poliansatüre yağ asitlerini tahrip eden bir zincir reaksiyonudur. Beyin dokusu yüksek miktardaki O<sub>2</sub> tüketimiyle lipid peroksidasyonuna özellikle duyarlıdır. Bu lipid peroksidasyonunda, beyin hasarının primer ve sekonder basamaklarında anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir (52). Beyin hasarından sonra artmış serbest oksijen radikaller; mikro vasküler otoregulasyon kaybına, iskemiye, membran fosfolipid peroksidasyonuna ve aşırı miktarda Ca<sup>+2</sup> depolanmasına yol açar ki bunların post travmatik hücre hasarı ve ölümünde major rol oynadığı düşünülmektedir. Beyin dokusu bunlara ilave olarak yüksek oranda Fe<sup>+3</sup> ve Cu<sup>+2</sup> vardır, bunlarda serbest oksijen radikal oluşumunu kolaylaştırıcı maddelerdir (43).

$\infty$  – tokoferol, yağda çözünür, etkili bir antioksidandır. 1984’de Burthorn ve arkadaşları,  $\infty$  – tokoferolun güçlü bir zincir kırıcı olduğunu söylemişlerdir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksil ve alloksil radikalleri bu yağ asidi yan zinciri yerine  $\infty$  – tokoferolle reaksiyona girer ve böylece reaksiyon durdurulmuş olur. Membran stabilitesi ve permeabilitesi de korunmuş olur (68).

Bu çalışmada, post travmatik beyin dokusunda lipid peroksidasyon ürünü MDA ve antioksidan savunma mekanizmalarında görev alan GSH ve GPx düzeyleri ve bunlara  $\infty$  – tokoferolün etkisi araştırıldı. Ayrıca bu çalışmamızda Modifiye Feeney metodunu kullandık. Bu metod, beyinde patofizyolojik değişikliklere uygun şekilde lezyon oluşturulmasında kullanılan ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir (49).

Kantos ve Wei’nin çalışmalarında olduğu gibi bizde beyin dokusu laserasyonunu önlemek için durayı intakt bırakarak lezyonu gerçekleştirdik. Eğer beyin dokusu lasere edilerek lezyon oluşturulursa, MDA ölçümleri sırasında yanlış sonuçlar almamıza neden olabilir. Çünkü, malondialdehit TBA yöntemi ile ölçülmekte ve lasere beyinde açığa çıkan hemoglobin ışığı absorbe edebileceğinden hatalı sonuçlar çıkabilir (51). İnvivo üretilen serbest oksijen radikallerin en sık kullanılan ölçüm metodu, TBA etkileşimli substrat ölçüm metodudur. TBA, malondialdehit için spesifik olmamasına rağmen bu metodun lipid peroksidasyonu için güvenilir bir indikatör olduğu kabul edilmektedir (44).

1972 yılında Ortega kafa travmalarının tedavisinde farmakolojik bir temel ileri sürmüş; hasarlanmış beyin dokusundaki destrüksiyonun özellikle serbest

oksijen radikallerinden kaynaklandığını ve bu olayda ana basamağın vasküler permeabilitedeki artış olduğunu bununda sebebinin serbest oksijen radikallerinden kaynaklandığını belirtmiştir. Long ve arkadaşları post travmatik dönemde beyin ödemi tedavisinde antioksidan maddelerin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (43,52). Bu amaçla ilk önce denenen madde, endojen SOD'dur. Bu enzimin serbest oksijen radikal düzeylerini yeterince düşürmediğini göstermişlerdir. Bunun nedeni, molekül ağırlığının 31.000 olması ve KBB'nin geçememesi ayrıca biyolojik yarılanma ömrünün 6 dakika olması bu enzimin klinik açıdan kullanımını sınırlar. Polietilen glikol konjugasyonlu SOD bileşimleri klinik ve deneysel çalışmalarda kullanılmış ancak 1996'da Young ve arkadaşları başarılı sonuçlar elde edememişler (16,44).

∞ - tokoferol normalde biomembranlarda ve plazmada bulunan bir antioksidandır. Membran permeabilitesini ve stabilitesini kontrol edebilmektedir. Bu amaçlı geliştirilen, kompres beyin ödemi modeli İshii ve arkadaşlarının geliştirdikleri bir modeldir. Epidural hematoma'nın klinik durumunu göstermesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu modelde, Yoshida ve arkadaşlarının yaptığı 1983 ve 1985 yıllarındaki çalışmada; E vitamininden fakir, normal ve E vitamini ilaveli beslenen ratlara, epidural baskılamayı takiben 24 saat içinde aynı bölgede gelişen ödem ve  $Su - Na^+$  miktarı değişikliklerine bakılmış. Ödem derecesi ve  $Na^+$  tutulum miktarı vitamin E'den fakir beslenen grupta daha belirgin, E vitamininden zengin beslenen grupta daha az olarak tespit edilmiş (85,86).

İnci ve arkadaşlarının 1998'de yaptıkları zaman ve seviye ilişkili çalışmada kullanılan Feeney modeli, uygulanan başka bir travma modelidir. Burada serbest ağırlık düşürme mekanizması kullanılmıştır. Ancak kullanılan rehber tüpte hava delikleri mevcuttur. Uygulanan kuvvet, burada bu delikler

sayesinde süspanse olmaktadır. Ayrıca 200 – 600 – 1000 gr.'lık ağırlıklar kullanmışlardır.

Bizim uyguladığımız, Patrich ve arkadaşlarının 1995 yılında yayınladıkları Modifiye Feeney modelinde (49); rehber tüpte hava delikleri yoktur, sadece 50 gr.'lık kuvvet uygulanmıştır, süspanse olmadığı için ağırlık direkt dural yüzeye yansımaktadır. Ayrıca yarı otomatik hale getirilen bu modelde elektromıknatıs kullanıldı ve yardımcı kuvvetler böylece engellenmiş oldu.

İnci ve arkadaşlarının yaptığı benzer çalışmada hafif ve ağır travmalı gruplar oluşturulmuş. Aynı şekilde travma öncesi 100 mg/kg intraperitoneal  $\alpha$  - tokoferol verilmiştir. Hafif travmadan sonra,  $\alpha$  - tokoferol verilen hayvanlarda lipid peroksidasyon düzeyi,  $\alpha$  - tokoferol verilmeyen gruptaki hayvanlarla karşılaştırıldığında belirgin bir azalma göstermiştir. Ağır travmadan sonra da yine aynı şekilde yapılan çalışmada anlamlı bir fark bulunmuş (44).

1995 yılında Grisar,  $\alpha$  - tokoferolün ve analoglarının invivo ve eks vivo lipid peroksidasyonunu önlediği ve fareyi santral sinir sistemi travmasının oluşturacağı hasardan koruduğunu göstermiştir (33). Biz bu çalışmada  $\alpha$  - tokoferolü intraperitoneal olarak, yeterli serebral hücre membran düzeyine ulaşabileceği 8 saat öncesinden ratlara uyguladık. Travmadan 12 saat sonra, yeterli ödem oluşumu için geçen süre sonunda ratlara dekapitasyon işlemini uyguladık. Modifiye Feeney metoduna göre oluşturulan kontüzyonlu beyin homojenatlarında MDA, GSH ve GPx düzeyleri ölçüldü.

$\infty$  - tokoferol verilen travma oluşturulan grupta, lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyinin,  $\infty$  - tokoferol verilmeyen gruba göre belirgin olarak azaldığı saptandı. Bu iki grup arasındaki lipid peroksidasyon düzeylerinde belirgin istatistiksel fark vardır ( $p < 0,05$ ).

Aynı çalışmada ölçülen GSH seviyeleri, sham grubunda travma ve çözücü grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p < 0,05$ ). Sham grubu ile  $\infty$  - tokoferol verilen grup arasında da fark vardı ancak anlamlı değildi. Yeterli yükselme yoktu.  $\infty$  - tokoferolün, lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan savunma sistemlerinde olumlu etki yaptığını düşünebiliriz.

Yine aynı şekilde çalışılan GPx düzeyleri arasında çözücü ve travma grubu ile sham ve  $\infty$  - tokoferol grupları arasında fark vardı ancak anlamlı bir fark bulunmadı.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar,  $\infty$  - tokoferolün lipid peroksidasyonunu azalttığı gerçeğini desteklemekte ve bununla paralellik göstermektedir (44). İleriki yıllarda,  $\infty$  - tokoferolün ve diğer antioksidanların sadece nöroprotektif değil tedavi edici özelliklerinden de faydalanabileceğimizi düşünüyoruz.

## SONUÇ

Travmatik beyin lezyonlarında, sekonder hasarın oluşmasında major mekanizmalardan biri, serbest oksijen bağlantılı lipid peroksidasyondur. Bir antioksidan olan  $\alpha$  – tokoferolun travmatize beyin dokusunda, lipid peroksidasyonuna ve antioksidan sistemlerin etkilerini araştırdık.

Bu çalışmada ratlarda deneysel travmatik beyin hasarı oluşturmak amacıyla Modifiye Feeney metodunu kullandık (49). Kullanım sırasında bir takım yeni düzenlemeler yapıldı. Öncelikle, elle ağırlık düşürme işlemi yapılmadı. Ağırlık, elektromıknatis yardımıyla elektrikli role kullanılarak düşürüldü ve yarı otomatik hale getirildi. Böylece elle düşürme yönteminde oluşan yardımcı kuvvetler ortadan kalktı. Bu teknik, Dr. Durmaz tarafından modifiye edildi ve Dr. Baloğlu'nun "Ratlarda Oluşturulan Deneysel Travmatik Beyin Hasarında, MCI – 186'nın Lipid Peroksidasyonuna Etkisi – 1999" konulu tezinde kullanıldı.

Çalışmada, ratlara uygulanan travmatik hasardan 12 saat sonra dekapitasyon işlemi uygulandı. Elde edilen beyin dokularında lipid peroksidasyon göstergesi MDA ve antioksidan savunma sisteminin göstergeleri GSH ve GPx değerleri biyokimya laboratuvarında ölçüldü.

Alınan sonuçlarda,  $\alpha$  – tokoferol verilen travma oluşturulan grupta, MDA düzeyinin  $\alpha$  – tokoferol verilmeyen gruba göre belirgin olarak azaldığı görüldü.



Yine alınan sonuçlarda, GSH düzeyinin sham ve  $\alpha$  – tokoferol verilen grupta, travma ve çözücü verilen gruba göre anlamlı yüksek olduğu görüldü. Burada lipid peroksidasyonunun  $\alpha$  – tokoerol tarafından engellendiği, antioksidan savunma sistemlerinin olumlu etkilendiği düşünülebilir.

Ayrıca GPx seviyelerinin belirgin değişiklikler göstermemesi bu enzimin beyinde orta düzeyde bulunmasıyla ilgili olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak; travmatik beyin hasarlı grupta lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit, kontrol grubuna göre oldukça yükselmiştir.  $\alpha$  – tokoferolün, travmatize beyin dokularında lipid peroksidasyon düzeyini belirgin şekilde baskıladığı tespit edilmiştir.

Uyguladığımız travma modeli geliştirilerek daha kolay, ucuz ve pratik bir deneysel travma modeli haline getirilebilir.

## KAYNAKLAR

1. **Akkuş İ**, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya, 47 – 55, 1995.
2. **Alp H**, Beyin ödemi Temel Nöroşirürji I, Ankara, 1997.
3. **Awasthi D**, Chuch DF, Torbati D, Corey ME. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats. Surg. Neurology. 1997; 47: 575 – 582.
4. **Bangalore R**, Shivakumor, Sastry VR. Glutathione homeostasis in brain during reperfusion following bilateral cerotid artery occlusion in the rat. Molecular and Cellular Biochemistry 1992; 111: 125 – 129.
5. **Bast A**, Haern GRM, Doelmen CJA. Oxidants ve antioxidants: State of the art. Am J – Med. 1991; 91 (supp 3C) 2 – 12.
6. **Bazen NG**, Redriquez de Turco EB. Membran Lipids in the pathogenesis of brain edema. Phospholipids and arachidonic acid, the earliest membrane compenents changed at the onset of ischemia. In cervos – Navamo, J. Ferszt (eds) Advences in Neurology, 28, Newyork, Raven press pp. 197 – 205.
7. **Beckman JS**, Beckman TW, Chen S, Mersehall PA. Apperent hydroxyl radical production by peraxy nitrite, implications for endothelid injury from nitric oxide and superoxide proc Natl Acad sci. USA. 1990; 87: 1620 – 1624.
8. **Bjerneboe A**, Absorbtion transport and disturbition of vitamin E. J. Nutr. 1990; 120: 233 – 242.
9. **Black KL**, Haft JT. Leukotriens increas blood – brain barrier permeability following intraparanchimal injection in rat. Ann Neuro 1985; 18: 349 – 351.
10. **Black KL**, Haft JT, McGillicuddy JE. Increased leukotriene C4 and vazogenic edema surraonding brain tumors in humans. Ann Neurolog 1986; 19: 592 – 595.

11. **Boloventa PF**, Wondosell F. CNS glial scar tissue; a source of molecules which inhibit central nervous system out growth. Neuronal – astrocytic interactions; Pathological implications. 1992; 367 – 380.
12. **Cadet JL**. Free radical mechanisms in the CNS: An overview. Intern. J. Neuroscience. 1988; 40: 13 – 18.
13. **Carpenter D**, Vitamin E deficiency. Sem. Neurol. 1985; 5: 283 – 287.
14. **Chan PH**, Fishman RA, Lenger S. Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemia and injury Drug Brain Res. 1985; 63: 277 – 235.
15. **Chan PH**, Fishman RA. Oxygen – free Radicals potential edema mediators in brain injury. Brain Edema 1985: 317 – 323.
16. **Chan PH**, Fishman RA. Protective effect of liposome entrapped superoxide dismutase on posttraumatic edema. Ann. Neurol 1987; 21: 540 – 547.
17. **Chan PH**, Role of Oxidants in ischemic brain damage stroke. 1996; 27: 1124 - 1129.
18. **Choi DW**. Ion dependence of glutamate neurotoxicity J. Neuroscience 1987; 7: 369 – 375.
19. **Clasen RA**, Pandolf S, Laing J. Experimental study of relation of fever to cerebral edema J. Neurosurgery 174; 41 – 576.
20. **Cohen G**, Oxyradical toxicity Catecholamine neurons. Neurotoxicology 1984; 5:77 – 82.
21. **Damopoulos HB**, Flamm E, Seligman M. Oxygen free radicals in central nervous system ischemia and trauma. In auter AP (ed) pathology of oxygen Newyork, Academic Press, 1982; PP 127 – 155.
22. **Ellis F**, Dodson Y, Police Richard J. Restoration of cerebrovascular responsiveness to hyperventilation by the oxygen radical scavenger n –

- acetylcysteine following experimental traumatic brain injury. *J. Neurosurgery* 1991; 75: 774 – 779.
23. **Epstein FH.** Oxygen – derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985; 312: 159 – 163.
24. **Erden M,** Bor N.M., Changes of reduced glutathione, glutathione reductase and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Bio. chem. Med.* 1984; 31: 217 – 227.
25. **Erden M,** Bor N.M., Redükte glutatyon ve glutatyon redüktaz enziminin klinik önemi. *Doğa Tr. J.med.Sci.* 4: 24 – 32, 1980.
26. **Faden AZ,** Salzman S. Pharmacological strategies. *TIPS – January, 1992;* (Vol. 13)
27. **Faden AZ,** Role of opioids in central nervous system injury; *Handbook of experimental pharmacology* 1993; 325 – 341.
28. **Faden AZ,** Salzman SK. Experimental pharmacology. The neurobiology of CNS trauma. 1994; 227 – 244.
29. **Faden AZ.** Pharmacological treatment of central nervous system trauma *Pharmacology & Toxicology* 1996; 78: 12 – 17.
30. **Giulion D.** The consequences of inflammation after injury to the central nervous system. *The neurobiology of CNS trauma* 1994; 155 – 164.
31. **Gotoda T,** Arito M., Adult onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the  $\alpha$  - TTP. *N. Engl. J. med* 1995; 333: 1313 – 1318.
32. **Graham DJ,** Adams SH. Ischemic Brain damage in fatal head injury. *Lancet* 1971; 1: 265.
33. **Grisar J.M,** Bolkenius F.N., Petty M.A. 2 - 3 Dihydro - 1 - Benzofuran - 5 ols as analogues of  $\alpha$  - tocopherol that inhibit invitro and exvivo lipid autoxidation and protect mice against central nervous system trauma *J. med, Chem.* 1995; 38: 453 – 458.

34. **Hall ED**, Braugher JM. Free radicals in CNS injury molecular and cellular approaches in the treatment of neurological disease 1993, 81 – 105.
35. **Halliwell B**, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine Arch Biochem Biophys 1986; 246, 201 – 214.
36. **Halliwell B**. Gutteridge JMC. Role of free radicals on catalytic metal ions in human disease An overview. Methods in Enzymology 1990; 186: 1 – 85.
37. **Halliwell B**. Reative oxygen species in living systems; source, biochemistry, and role in human disease Am J. Med 1991, 91 (supp 3C): 14 – 22.
38. **Halliwell B**, Gutteridge JMC. Oxjen toxicity, oxygenradical transition metals and disease Biochem. J. 1984; 219: 1 – 14.
39. **Hatemi H**, Taşan E., Serbest radikaller ve diyabet Endokronolojide Yöneliş. 2: 33 – 34.
40. **Holley AE**, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions in vivo. British Medical Bulletin 1993; 49/3: 494 – 505.
41. **Ikeda Y**, Anderson James H, Long M. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. Neurosurgery 1989; 24: 679- 685.
42. **Ikeda Y**, Bresford KL, Long DM. Oxygen free radicals in traumatic brain edema Neurol Res. 1989; 11: 213 – 216.
43. **Ikeda Y**, Long DM. The moleculer basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990; 27: 1 – 11.
44. **İnci S**, Özcan Osman E, Kamer K. Time level relationship for lipid peroxidation and the protective effect of  $\alpha$  - tocopherol in Experimental Mild and Severe Brain İnjury, Neurosurgery 1993; 43. 2; 330.
45. **Kayaalp O**. Tıbbi Farmakoloji. Ankara, 1990; 2: 1569 – 1571.
46. **Kimelberg HK**, Nereberg MD. Astrocytic responses to CNS trauma. The neurobiology of CNS trauma. 1994; 193 – 208.

47. **Klatzo Z.** Presidential address: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol Exp. Neurol* 1967; 26: 1 – 14.
48. **Klatzo Z,** Piraux A, Laskowski E. The relationship between edema, blood brain barrier and tissue elements in local brain injury. *J. Neuropathol* 1958; 17: 548 – 563.
49. **Kochanek M,** Clark SB, Schiding K. Central nervous system trauma; *Research Techniques* 1995, 17: 247 – 253.
50. **Kantos A.** Oxygen radicals in cerebral vascular Injury. *Circ Rs.* 1985; 57: 508 – 516.
51. **Kantos A,** Wei P. Superoxide production in experimental brain injury *J. Neurosurgery* 1986; 64: 803 – 807.
52. **Kantos HA.** Poylishock oxygen radicals in brain injury. *Cent. Nerv. Syst. Trauma* 1986, 3: 257.
53. **Laurent B,** Ardaillou R. Reactive oxygen species: Production and role in kidney *Am. J. Physiol* 1986; 251: F765 – F776.
54. **Lemke M,** Frei B, Ames Bruce N. Decreases in tissue levels of ubiquinol – 9 and 10 – ascorbate and  $\alpha$  - tocopherol following spinal cord impact trauma in rats *Neuroscience letters*; 1990; 108: 201 – 206.
55. **Long DM,** Maxwell RE, Choi KS. Multiple therapeutic approaches in the treatment of brain edema induced by standart cold lesion, in Reulen HJ, Schurman K(eds): *Steroids and Brain Edema* Newyork, Springer. Verlag, 1972, pp 87 – 94.
56. **Mc. Cord JM.** Human disease, free radicals and oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351 – 357.
57. **Mc.Intosh TK,** Faden AJ. Endogenous opioid peptides and traumatik central nervous system injury. *The neurobiology of CNS trauma* 1994; 165 – 172.

58. **Miller JD**, Traumatic brain swelling and edema in cooper PR(ed) Head injury Baltimore, Williams and Wilkins 1993 pp: 331- 353.
59. **Ouachi K**, Arito M., Ataxi with isolated Vit - E deficiency is caused by mutations in the  $\alpha$  - TTP. Nat. Genet. 1995; 9: 141 – 145.
60. **Paglie DE**, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroksidase. J. Lab Clin Med. 1967; 70: 158 – 169.
61. **Panter S**, Faden AZ. Biochemical changes and secondary injury from stroke and trauma. Principles and practice of restorati and Neurology 1992, 32 – 52.
62. **Petty A**, Poulet P, Antoine Heas. Reduction of traumatic brain injury – induced cerebral edema by a free radical scavenger. European J. of Pharmacology 307 (1996) 149 – 155.
63. **Regan RF**, Choi DW. Excitotoxicity and central nervous system trauma 1994; 173 – 181.
64. **Saveren M**. Kafa Travmalarının Fizyopatolojisi. Temel Nöroşirürji I, Ankara, 1997.
65. **Siesjö BK**. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part II. Mechanisms of damage and treatment J. Neurosurgery 1992, 77: 337 – 354.
66. **Siesjö BK**. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I. Pathophysiology. J. Neurosurgery. 1992, 77: 169 – 184.
67. **Sies H**, Oxidative Stress from basic research to clinical application Am. J. med. 1991; 91: 31 – 38.
68. **Sies H**, Stohl W, Sundguist A.E., Antioxidant Functions of vitamins. Vit - E and C,  $\beta$  carotene and other Carotenoid. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992; 30: 7– 20.
69. **Sipahi T**, Arcasoy A., Serbest radikaller klinik hastalıklarla ilişkisi MN. Klinik bilimler. 2:7: 124 – 132, 1996.

70. **Slater TF.** Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222:1-15.
71. **Sokol R.J,** Keyden H.J., Bettis D., Isolated Vit - E deficiency in the absence of fat malabsorption familial and sporadic case. *J. Lab. Clin. Med.* 1988; 111: 548 – 559.
72. **Szczekliv A,** Gryglewski R.J., Effect on plazma lipid perosides, antioxidant activity prostacyclin generation and platelet aggregability. *Trom. Haemos.* Stuttgard, 1985; 54: 425 – 430.
73. **Traber M.G,** Sokol R.J., Lack of tocopherol in peripheral neuropathy N. *Eng. J. Med.* 1987; 317: 262 – 265.
74. **Tray CM,** Deressi D, Prochiantz A, Greene LA. Down regulation of Cu / Zn süperoksid dismutase leads to cell death via the nitric oxide – peroxynitrite pathology *J. Neurosci* 1996, 16: 253 – 261.
75. **Utenberg A,** Schmidh W, Whar M. Role of leukotriens as mediator compound in brain edema. In Long D (ed) *Advances in Neurology* 52. Newyork. Raven press 1990 pp 211 – 215.
76. **Uysal M.** Serbest Radikaller, lipid peroksilleri ve organizmada perosidan, antioksidan dengeyi etkileyici koşullar. *Klinik gelişim* 1998; II: 336 – 341.
77. **Vink R.** The measurement of metabolic changes after central nervous system trauma. *The neurobiology of CNS trauma.* 1994, 68 – 78.
78. **Wahl M,** Unterberg Schilling A, Baethimann A. Mediators of vasculer and paranchymal mechanisms in secondary brain damage. *Acta Neurochir* (1993) [suppl] 57: 64 – 72.
79. **Watanabe T,** Yuki S, Egawa M. Protective effects of MCI – 186 on cerebral ischemia. Possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994, Vol 268; 1597 – 1604.



80. **Weed LH**, McKibben PS. Experimental alteration of brain bulk. *Am J. Physiol* 1991, 48: 531 – 558.
81. **Weisiger R.A.**, Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology*, 1986; 90: 494 – 496.
82. **Wilkins H**, Pengachary S. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury Volume II B, 2623 – 2638.
83. **Yalçın AS**. Antioksidanlar. *Klinik gelişim* 1998; 2: 342 – 346.
84. **Yoshida S**, Brain injury after ischemia and trauma. The role of vitamin – E. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989: 570 (219 – 236).
85. **Yoshida S**, Busto R, Ginsberg MD. Compression induced brain edema; Modification by prier depletion and supplementation of vitamin E *Neurology* 1983; 33: 166 – 172.
86. **Yoshida S**, Busto R, Santino M. Compression İnduced brain edema in Rats; Effect of dietary Vitamin E on membrane damage in the brain. *Neurology* 1985; 35: 126 – 130.
87. **Young W**, Constantini S. İonic and waters shifts in injured cented nervous tissues. *The neurobiology of CNS trauma* 1994; 123 – 138.
88. **Young B**, Rurge JW, Waxman KS. Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled tiral, *JAMA* 1996; 276: 538 – 542.
89. **Yue TL**, Feurstein G. Platelet activating factor: a putative neuromodulatör and mediator in the pathophysiology of brain injury. *Crit Rev. Neurobiol.* 1994, 8: 11 – 24.