



TC.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA SİMVASTATİNİN
AKUT DÖNEMDEKİ KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Hatice YÜKSEL

TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YAVUZ

DÜZCE-2009

TEŐEKKÜR

Düzce Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı'nda hazırlamıő olduğum tıpta uzmanlık tezimin tüm aőamalarında ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü yardım ve desteğinden dolayı tez danıőmanım Doç. Dr. Özlem YAVUZ'a teőekkür ederim. Tıpta uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Ramazan MEMİŐOĐULLARI ve Doç. Dr. Abdurrahman COŐKUN'a teőekkür ederim.

Tez çalıőmam sırasında yardım ve desteklerinden dolayı Yard. Doç. Dr. Merih İŞ, Doç. Dr. Nil ÇOMUNOĞLU, Dr. Hayriye AK YILDIRIM, Dr. Nuri ORHAN, uzmanlık eğitimim süresince çalıőmaktan mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım, Nöroşirürji Anabilimdalı'nda araştırma görevlisi olarak çalıőan arkadaşlarım ve Mikrobiyoloji Anabilimdalı'nda çalıőan biyolog Ziya ERDOĞAN'a teőekkür ederim.

Son olarak, tıpta uzmanlık eğitimi ve tez hazırlama dönemlerinde her türlü desteği bana gösteren sevgili eőim Dr. Harun YÜKSEL'e teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Kafa Travması	3
2. 2. Primer Beyin Hasarı	4
2. 3. Sekonder Beyin Hasarı	5
2. 4. Sekonder Hücre Hasarında Temel Biyolojik Mekanizmalar	7
2. 4. 1. Kalsiyuma Bağımlı Hücre Hasarı	7
2. 4. 2. Eksitotoksisite	8
2. 4. 3. İnflamasyon	10
2. 4. 4. Oksidatif Hasar	13
2. 4. 5. Nitrik Oksit	16
2. 4. 6. Endotelinler	17
2. 4. 7. Apoptozis	17
2. 5. Travmatik Beyin Hasarında İkincil Hasardan Koruyucu Mekanizmalar (Nöroproteksiyon)	18
2. 5. 1. Endojen Koruyucu Mekanizmalar	18
2. 5. 2. Travmatik Beyin Hasarında Nöroprotektif Tedavi	22
2. 6. Travma Modelleri	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan Gereçler	29
3.1.1. Deney Hayvanları	29
3.1.2. Kullanılan Araçlar	29
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3. 2. Uygulanan Yöntemler	30
3. 2. 1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	30
3. 2. 2. Histopatolojik İnceleme	34
3. 2. 3. Biyokimyasal Analiz	35

3. 3. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	48
4. 1. Fizyolojik Ölçümler	48
4. 2. Histopatolojik Bulgular	48
4. 3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	53
4. 3. 1. TK, LDL-K ve HDL-K Düzeyleri	53
4. 3. 2. MDA Düzeyleri	54
4. 3. 3. SOD Aktivitesi	55
4. 3. 4. TAK Düzeyleri	56
4. 3. 5. VEGF Düzeyleri	57
4. 3. 6. Nitrik Oksit Düzeyleri	58
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	68
7. ÖZET	69
8. SUMMARY	71
9. KAYNAKLAR	73
10. RESİMLEMELER LİSTESİ	82
11. ÖZGEÇMİŞ	84
12. EKLER	85

SİMGE ve KISALTMALAR

AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit
ABTS	2, 2'-azino-bis (3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonik asit))
DAH	Diffüz Aksonal Hasar
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GPP	Geranil Pirofosfat
GSH	Redükte Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
GTP	Guanozin Trifosfat
Flk-1	Fetal Karaciğer Kinaz Reseptörü
Flt-1	Feline Sarkom Virus Benzeri Tirozin Kinaz Reseptörü
FPP	Farnesil Pirofosfat
HMG-KoA	3-Hidroksi-3-Metilglutaril-Koenzim A
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HDL-K	Yüksek Dansiteli Kolesterol
HIF-1 α	Hipoksiyle İndüklenen Faktör -1 α
IL-1	İnterlökin 1
IL-1R	İnterlökin 1 Reseptörü
IL-10	İnterlökin-10
LH	Linearite Hızları
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KİB	Kafa İçi Basıncı
LP	Lipid Peroksidasyonu
LDL-K	Düşük Dansiteli Kolesterol
MDA	Malondialdehit
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B

NMDA	N–Metil–D–Aspartik Asit
NO	Nitrik Oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit İyonu
OH ⁻	Hidroksil Radikali
OAKB	Ortalama Arteriyel Kan Basıncı
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PI3K	Fosfoinositid 3 Kinaz
PLA ₂	Fosfolipaz A ₂
PHD	Prolil Hidroksilaz Domain Protein
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD1	Bakır–Çinko Süperoksit Dismutaz
SOD2	Manganez– Süperoksit Dismutaz
SOD3	Hücre dışı Süperoksit Dismutaz
SSS	Santral Sinir Sistemi
TAK	Total Antioksidan Kapasite
TBH	Travmatik Beyin Hasarı
TGF-β	Transforme Edici (Dönüştürücü) Büyüme Faktörü
TK	Total Kolesterol
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
VEGF	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde kafa travmasından sonra ortaya çıkan travmatik beyin hasarı (TBH) medikal ve cerrahi tedavideki gelişmelere karşın hala önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Travma sonucu santral sinir sisteminde (SSS) ilk olarak primer beyin hasarı meydana gelmektedir. Primer beyin hasarı skalp yaralanması, kafatası kırığı, kontüzyon, beyin laserasyonu, diffüz aksonal hasar (DAH) ve intrakraniyal kanamaları içermektedir. Ancak kafa travması sonucu oluşan hasardan sadece primer hasar sorumlu değildir. Primer beyin hasarını takiben ortaya çıkan birçok karmaşık fizyopatolojik olaylara bağlı olarak saatler veya günler sonra sekonder beyin hasarı oluşmaktadır. TBH olan hastalarda sekonder hasarın, prognozu kötü yönde etkilediği gösterilmiştir. Sekonder hasarda rol alan mekanizmalar arasında nörotransmitter salınımı, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu, kalsiyum bağımlı hücre hasarı, gen aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyon yer almaktadır.¹

TBH sonrası gelişen biyokimyasal hasar ve hücre ölümünü sınırlayabilmek için antiinflamatuvar ilaçlar, eksitotoksisiteyi bloke eden ilaçlar, antiapoptotikler, serbest radikal tutucular, kalsiyum kanal blokerleri, büyüme faktörleri, steroidler ve statinler gibi birçok farmakolojik ajanın etkileri değişik hayvan modellerinde çalışılmıştır. Hayvan deneylerinde kapalı kafa travmasında, 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibitörleri olan statinlerin, serebral ödem ve sekonder nöronal hasara katkıda bulunan glial aktivasyonu ve inflamatuvar cevabı azalttığı bildirilmiştir.²

Klinik çalışmalarda, hayvan deneyleri kadar başarı sağlanamamıştır. Bunun nedeni olarak hayvan deneyi modellerinin, insanlarda oluşan TBH için yetersiz kaldığı ileri sürülmüştür. Çalışılan travma modelleri arasında santral ve lateral sıvı çarpma, sert cisimle yaralama, akselerasyon (yüksekten ağırlık düşürme), enjeksiyon, lokal gerilim, soğuk hasar, penetran yaralanmalar sayılabilir.³ Akselerasyon modelinin, sıvı-çarpma modeliyle birlikte insanda oluşan serebral kontüzyonu en iyi taklit eden modeller olduğu, yaygın hasar açısından bakıldığında ise en iyi modelin akselerasyon modeli olduğu bildirilmiştir.⁴

Çalışmamızda ağır kapalı diffüz beyin travması oluşturulan ratlara, travmayı takiben üçüncü saatte statin türevi bir ilaç olan simvastatin tek doz (1mg/kg/i.p.) verildikten 24 saat sonra kanda ve beyin dokusunda oksidatif stresin hücre düzeyindeki göstergesi olan lipid peroksidasyonunun (LP) son ürünü malondialdehit (MDA), total antioksidan kapasite (TAK), vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçüldü. Ayrıca beyin dokusundaki histopatolojik değişiklikler de incelenerek statinlerin akut travmatik diffüz beyin hasarında nöroprotektif rolünün araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Kafa Travması

Kafa travmaları öldürücü, sakat bırakıcı, uzun süre tedavi ve bakım gerektiren patolojik bir durumdur. Her gün biraz daha hızlanan yaşam koşullarında kafa travmalarının insidansı ve buna bağlı mortalite ve morbidite riski giderek artmaktadır.

Mekanik kafa travmasının etkileri kontüzyondan ağır koma ve ölüme kadar değişmektedir. Eğer hasta koma halinde (Glaskow koma skalası ≤ 8) gelirse ağır TBH düşünülmektedir. Bu hastalardaki mortalite oranı yaşlı hastalarda yüksek olmak üzere %30-%50 arasında değişmektedir. TBH'a bağlı gelişen ölümlerin yaklaşık %90'ı ilk 48 saat içinde gerçekleşmekte ve genellikle beyin sapı herniasyonuna ve kontrolsüz intrakraniyal basınç artışına bağlı olduğu düşünülmektedir.^{5,6}

TBH, direk darbe, hızlı yavaşlama veya hızlanma, delici bir alet (silah) veya bir patlamadan kaynaklanan dalgalar sonucu oluşan dış etkinin neden olduğu beyin hasarını içeren heterojen bir hastalıktır. Bu etkilerin kaynağı, yoğunluğu, yönü ve süresi hasarın şeklini ve sonuçlarını belirler.¹

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yılda 100.000'de 83,7 oranında tüm travmalara bağlı ölüm bildirilmiştir. Bu yaralanmaların büyük çoğunluğu az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir. Bu oran bizim ülkemizde 100.000'de 120'dir. Tüm travmalara bağlı yaralanmaların ise yaklaşık üçte biri SSS yaralanmalarını içerir. ABD'de yılda her 100.000 kişiden 200'ü kafa travmasına maruz kalmakta ve ölüm oranı 100.000'de 25 olarak gerçekleşmektedir. TBH'a neden olan başlıca travmaların %39'unun ateşli silah yaralanmasına, %34'ünün motorlu taşıt kazalarına, %10'unun yüksekten düşmeye ve %17'sinin de diğer nedenlere bağlı olduğu saptanmıştır.⁷ Yüzde 25'lik oranla motorlu taşıt kazaları kafa travması nedenleri arasında ilk sırada bildirilmiştir.⁸ Motorlu taşıt kazalarına bağlı ölümler, bütün ölüm nedenleri içinde 5-29 yaş grubunda ikinci, 30-44 yaş grubunda ise üçüncü sırada yer almaktadır.⁹

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, 2006 yılı boyunca acil polikliniğine kafa travması nedeniyle başvuran 1787 olgudan kliniğe yatırılan 430 olgu değerlendirilmiş, travmatik beyin hasarının en sık iki nedeninin yüksekten düşme (%40) ve motorlu taşıt kazaları (%37) olduğu gözlenmiştir.¹⁰

Özellikle son iki dekatta kafa travmalarının fizyopatolojisi hakkındaki bilgilerin artması, travmatik beyin hasarından sonra gelişen sekonder nöronal hasarın fizyolojisinin anlaşılması ile uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması ve yoğun bakımdaki hasta bakım tekniklerindeki gelişmeler mortalite oranlarını azaltmış, prognozda belirgin iyileşme sağlamıştır.

2. 2. Primer Beyin Hasarı

Primer beyin hasarında makroskopik düzeyde bakıldığında beyaz madde yollarında kopma, fokal kontüzyonlar, intraserebral veya ekstraserebral hematomlar ve diffüz ödem görülebilir. Hücresel düzeyde ise, ilk hasardan dakikalar ya da saatler sonra, membranlarda küçük deliklerin oluşması, iyon kanallarından sızıntılar ve proteinlerde yapısal değişiklikler gibi erken sinir hasarı bulguları ortaya çıkar. Şiddetli yırtılmalar mikrohemorajilere neden olabilir.

Patofizyolojik olarak primer beyin hasarı, fokal ve diffüz olarak ikiye ayrılmaktadır. Fokal beyin hasarında kubbe ve kaide kırıkları gibi kafatası kırıkları, kontüzyon ve hematomlar görülür.¹

Kontüzyon, beynin derin yapılarının deformasyonu olup komaya kadar varabilen bilinç kaybı ile seyreden yaygın nörolojik hasara yol açar ve DAH daha hafif bir formu olarak kabul edilir. “Kup” veya ”kontrakup” kontüzyonlar vasküler harabiyet ile doku harabiyetinin kombinasyonu ile oluşur. Kup kontüzyon, kafatasına direk olarak gelen darbeye bağlı bir kuvvetin etkili olduğu bölgede, kontrakup kontüzyon ise darbeye bağlı kuvvetin etkili olduğu bölgenin zıt tarafında, beynin deforme olup tekrar eski şeklini alması sürecinde meydana gelen negatif basınç sonucu oluşur.¹¹

Travmatik intrakraniyal kanamalar ağır TBH bulunan hastaların %25 - %35’ inde, orta TBH olan hastaların %5-%10’unda görülebilmektedir.¹ Epidural hematomlar, daha az sıklıkta görülmekte ve genellikle düşük hızlı künt travmalara bağlı olmaktadır. Epidural hematomun yarısından fazlası serebral hemisferin konveksitesinde arteria meningea media ve dallarının beslediği bölgelerde görülür. Subdural hematoma, kanın duramater ile araknoid membran arasındaki subdural mesafede toplanmasıdır ve büyük çoğunluğu venöz kökenlidir. Beynin

hareketi ile bağlantılı lezyonlardır. Orta veya ağır kafa travmalarından sonra oluşan intraserebral hematoma, genellikle kitle lezyonu oluşturur ve çoğu travmadan sonra ancak 24 saatte görünür hale gelir. Kurşun yaralanmaları, perforasyon yaralanmaları ve depresyon fraktürleri gibi darbenin, kafanın nispeten küçük bir bölgesine isabet ettiği vakalarda görülür.¹²

DAH, genellikle motorlu araç kazalarından sonra fokal ve diffüz beyin travmasında travmanın şiddetinden bağımsız olarak oluştuğu gibi iskemi sonucu da ortaya çıkabilir.¹³ Beyin ve beyin sapı boyunca aksonlarda morfolojik ve fonksiyonel hasarla karakterizedir ve beyaz cevherde diffüz dejenerasyona yol açar.¹⁴ DAH'ın kötü prognoz için gerçekçi bir gösterge olduğu kanıtlanmıştır ancak hala tanı koymada güçlükler vardır.¹⁵ DAH'a yol açan, ilk travmanın etkisi ile oluşan yırtılma kuvvetlerinin dışında gecikmiş başka mekanizmaların olduğu görülmüştür. Travmayı takiben gelişen primer beyin hasarında DAH'ın karakteristik özellikleri olarak, şişen aksoplazmaya ait amorf-belirgin bir şekle sahip olmayan ve retraksiyon topları olarak adlandırılan, beyaz cevher içerisine dağılmış aksonal parçalanmalar görülür.¹⁶

Aksonal hasar için özgül immunohistokimyasal belirteçler, gelişmiş görüntüleme teknikleri ve serum biyobelirteçlerinin kullanılması ile beyaz cevher hasarının ilerleyen ve gecikmiş dejeneratif bir süreç olduğu orta ve şiddetli TBH'da oluşabileceği gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar, beyaz cevher hasarının aktif ilerleyen bir süreç olduğunu göstermiştir. Travmayı takiben inflamasyonun neden olduğu aktif lezyonlar görülür, hücre iskeletinde kırılmalar olur ve sonuçta aksonal iletim bozulur. Beyaz cevher lezyonlarının daha önce düşünülenenden daha fazla olarak birçok semptomdan sorumlu olabileceği ve hafif TBH'dan sonra hastaları etkileyen ilerleyen nörokognitif sorunların kaynağı olabileceği artık kabul edilmektedir.¹²

2. 3. Sekonder Beyin Hasarı

Hipoksi ve hipotansiyon sekonder beyin hasarının oluşmasında temel rol oynamaktadır. Travmadan sonraki ilk 24 saat içinde serebral kan akımı normal bireylerdakinin yarısına kadar inmekte ve iskemik sınırlara varmaktadır. Yapılan otopsilerde %80 oranında post travmatik iskemik lezyonlara rastlanmıştır.¹² Kafa travması sürecindeki olaylar genellikle aynı anda gerçekleşir ve intrakraniyal olarak birbirlerine karşı etkileri karmaşık olabilmektedir. Beyin perfüzyon basıncındaki düşüş, intrakraniyal basıncın artması veya sistemik arteriyel basıncın azalmasına bağlıdır. Sonuçta serebral dolaşım zarar

görebilmektedir. Eğer sistemik hipoksi mevcutsa beyin oksijenasyonunun daha fazla tehlike altında olduğu söylenebilir.¹⁷

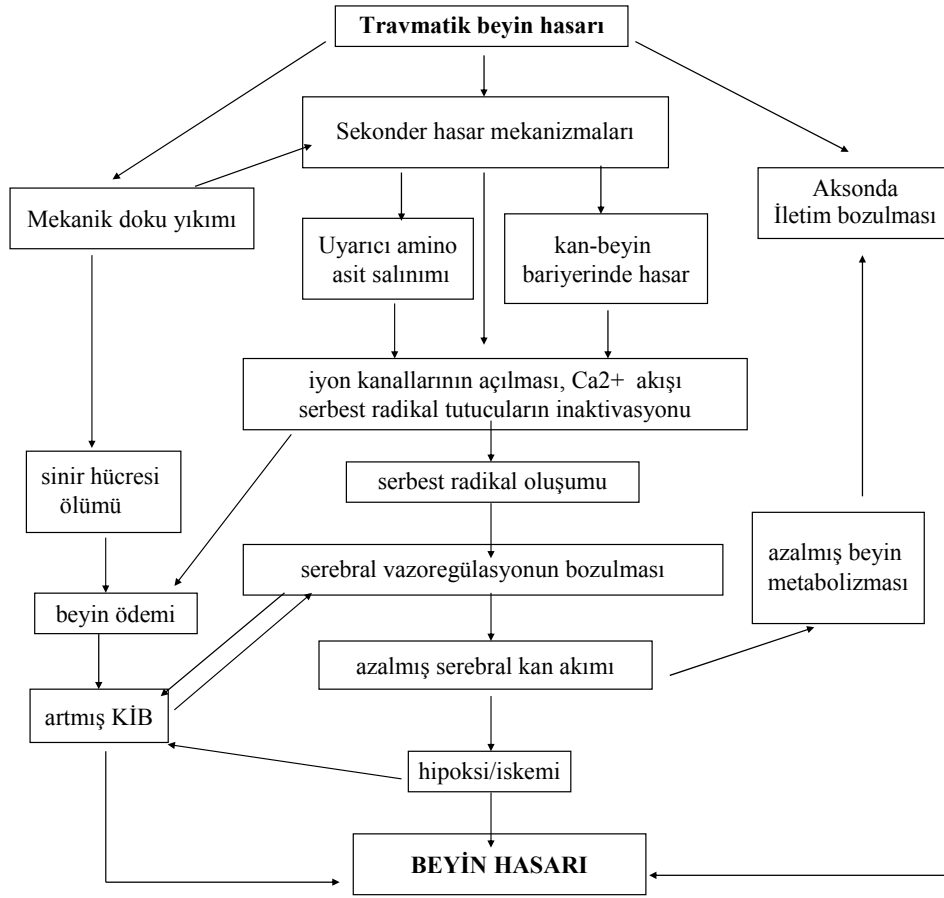
Serebral kan akımı, 100 gram beyin dokusundan 1 dk'da geçen mililitre cinsinden kan miktarıdır ve beyinde bölgesel olarak değişmekle beraber, ortalama 50 mL/100g/dk'dır. serebral kan akımı 18 mL/100g/dak'ın altına düşerse geri dönüşümsüz nöronal hasar ortaya çıkar. Serebral perfüzyon basıncı, kanı beyine iten güç olup, ortalama arteryel kan basıncı ve kafa içi basıncı arasındaki farktan oluşur [Serebral perfüzyon basıncı = ortalama arteryel kan basıncı - kafa içi basıncı (KİB)]. Serebral vasküler direnç ise, kanın serebral arterlerden venlere doğru akımına karşı koyan güçtür. Bu da başlıca kan viskozitesine ve vasküler faktörlere bağlıdır.^{12,18} Serebral kan akımı değişikliklerinde serebral arterler, kapillerler, venüller ve venler önemli rol oynarlar. Serebral kan akımı değerleri serebral vasküler direnç ile değişir. Direnci azaltan; kan pH düşmesi, serebral metabolizmanın artması, pCO₂'nin artması ve pO₂'nin 50 mmHg'nin altına inmesi gibi faktörler serebral vazodilatasyona neden olarak serebral kan akımını artırır. Direnci artıran; kan pH yükselmesi, serebral metabolizmanın azalması ve pCO₂'nin azalması gibi faktörler de serebral vazokonstrüksiyona neden olarak serebral kan akımını azaltır.¹⁸

Akut kafa travmasında KİB'in artması serebral kan akımını azaltır. Bunun sonucu olarak beyine gitmek üzere arkus aorta ve karotid arterlerden geçen kan miktarı azalır ve aortik ark ve karotid sinüste bulunan baroreseptörlerden kalkan impulslar bulbusta bulunan vazomotor refleksi uyarak kalpten pompalanan kanı artırır. Böylece sistemik arteryel kan basıncını artırarak serebral kan akımının artmasına neden olur ve beyin dokusunun beslenmesi için gerekli olan perfüzyon basıncını sağlamaya çalışır. "Cushing refleksi cevabı" olarak bilinen bu koruyucu mekanizma klinikte ani tansiyon yükselmesi ile kendini gösterir.¹⁹

Akut kafa travmalı hastalarda, serebral dokuların kanlanması için gerekli olan perfüzyon basıncı 70 mmHg'nin üzerinde olmalıdır.¹² 50 mmHg'nin altına indiğinde hipoksi, 40 mmHg'nin altına indiğinde iskemi oluşur ve beyinde otonöregülasyon bozularak irreversible değişiklikler başlar.²⁰

Kafa travmasında prognozu etkileyen faktörlerden birisi de KİB'dir. KİB'in normal değerleri erişkinlerde 0–10 mmHg'dır. Erişkinlerde 20 mmHg (1 mmHg = 1.36 cmH₂O) üzeri basıncın 5 dakikadan uzun sürmesi patolojik olarak kabul edilir. KİB arttığında önce kan, sonra da BOS kafa içi boşluğunu terk eder ve bunların terk ettiği yeri beyin doldurur ve herniyasyon tabloları oluşur. KİB'in normal sınırlarda tutulması, kafa travmalarında mortalite ve morbiditeyi düşürmektedir ve tüm tedavilerde KİB'i azaltmak amaçlanmalıdır.¹²

2. 4. Sekonder Hücre Hasarında Temel Biyolojik Mekanizmalar



Şekil-1. Sekonder hücre hasarında gelişen hücresel mekanizmalar.²¹

Bütün kafa travmaları değişik süreç ve sonuçlara yol açabilecek birçok farklı patofizyolojik mekanizmaları (Şekil-1) başlatabilir. Sekonder hasar saatler veya günler sonra gelişir ve kalsiyuma bağımlı hücre hasarı, nörotransmitter salınımı, ROT oluşumu, gen aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar yanıtı içerir.¹

2. 4. 1. Kalsiyuma Bağlı Hücre Hasarı

Beyaz ve gri cevherdeki sekonder hasarın ilerlemesinde, anormal kalsiyum dengesi önemli rol oynamaktadır. Sinir hücre hasarında eksitotoksik hücre ölümü, programlanmış hücre ölümünün başlaması ve postsinaptik reseptör modifikasyonları ile ilişkilidir. Aksonal hasarda kalsiyum, aksonlar arasındaki bağlantının kesilmesi ile sonuçlanan olaylar kaskadını başlatır. Hem sinir hem de aksonal hasarda fazla kalsiyum erken mitokondriyal şişme ile

ilişkilidir.²² Mitokondri tarafından fazla kalsiyum tutulması kendi membranında depolarizasyona, membran permeabilite geçiş porlarının açılmasına ve programlanmış hücre ölümü faktörlerinin salınışının başlamasına neden olur.²³ Mitokondriyal fonksiyonun kaybolması yalnız kalsiyum tamponlama kapasitesini elimine etmez, aynı zamanda ATP bağımlı iyon pompalarının bozulması ile sonuçlanan kalsiyum akışına katkıda bulunur. İmmünsüpresif ve mitokondriyal membran permeabilite porlarının inhibitörü bir ilaç olan siklosporin A'nın aksonal patoloji ve nöronal hücre kaybını azaltması bu durumun önemini açıklayan bir örnek olarak verilebilir.²⁴

Beyaz cevherin sekonder hasarında önemli diğer mekanizma aksonal membranın sızdırır yani hücre dışı kalsiyumun geçişine izin verir hale gelmesidir.²⁵ Aksonda kalsiyumun artması sonucu, ana yapısal proteinleri indirgeyen enzimler uyarılır ve aksonun şeklinin korunmasından ve transporttan sorumlu proteinler zarar görür. Tüm bu olaylar taşınmış proteinlerin birikimine, aksonal ödeme ve sonunda iletimin bozulmasına neden olur.²⁶

Bir enzim ailesi olan kalpainler aksonal hasarın ana mediatörleri olarak oldukça ilgi görmektedirler. Bu enzimlerin farmakolojik antagonistleri hayvan modellerinde güçlü bir koruma sağladıkları için beyaz cevher hasarında potansiyel tedavi hedefi olabilirler.^{27,28} Kalpainler hücre içi kalsiyum düzeyinin düşük olması gibi normal fizyolojik durumlarda birçok düzenleyici fonksiyonu yerine getirirler. Patofizyolojik durumlarda ise yapı ve transporttan sorumlu aksonal proteinleri hedef alırlar.²⁹

2. 4. 2. Eksitotoksisite

Beyin travmasını takiben uyarıcı nörotransmitter glutamatın hücre dışı konsantrasyonu artar.³⁰ Presinaptik membrana bağlı iyon pompalarının bozulması ve kalsiyum aracılı ekzositoz, nöronlardan depolarizasyona bağlı glutamat salınımına neden olur.³¹ Bu fazla nörotransmisyonun hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun toksik düzeyde artışına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Glutamat reseptörleri kimyasal agonistlerine duyarlılıklarına göre AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit) veya NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri olarak sınıflandırılır.

AMPA reseptör iletiminde gerilmeye bağlı değişiklikler tanımlanmıştır. Benzer olarak kortikal nöronlara travmatik hasar AMPA reseptör agonistlerine artmış iletim cevabına yol açar. Hasarlı nöronlarda daha fazla AMPA reseptör iyon iletimi, güçlü hipereksitabilite, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonlarında artış görülür ve diğer toksik olmayan

konsantrasyonlardaki sentetik glutamat reseptör analoglarına duyarlılık gösterirler.³² AMPA-reseptör duyarsızlaşmasında azalma veya fazla duyarlılık olduğunda, travmadan sonra sinaptik glutamatın kısa süreli artışına bağlı nörotoksisite hipereksitabiliteye, epileptik aktiviteye veya kalsiyuma bağlı hücre şişmesine, hücre hasarı ve ölümüne yol açabilir.

AMPA reseptörleri 4 alt birime sahiptir (GluR₁₋₄). GluR₂ alt birimi eksik reseptörler kalsiyuma fazla geçirgendir.³³ TBH'ı takiben hasar alanını infiltre ettiği bilinen proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) belirgin olarak hücre kültüründe nöronlardaki sinaptik GluR₂ düzeylerini azaltır ve GluR₂ alt birimi eksik AMPA reseptörlerinin yüzey ekspresyonunu artırır.³⁴ Sinaptik glutamat ile birleştiğinde, hasarlı glia ve inflamatuvar hücrelerden salınan TNF- α tarafından kompozisyonu yeniden düzenlenen AMPA reseptörleri, hasar sonrası kalsiyumun aşırı yüklenmesine yol açar. Bir inflamatuvar mediatör ve glutamaterjik sinir iletimi arasındaki bu ilişki, AMPA reseptörlerine bağlı gecikmiş eksitotoksisite için yeni bir ışık tutmaktadır.

GluR₂ alt birimi eksik AMPA reseptörleri çinkoya da fazla geçirgendir.³⁵ Serbest çinko, çinko dengesini korumak için mitokondri tarafından alınır. Mitokondriye fazla kalsiyum alınmasına benzer olarak, mitokondriyal disfonksiyona, uzamış mitokondriyal membran potansiyel kaybına ve ROT oluşumuna yol açar.³⁶ Bu etkiler GluR₂ kaybının nöronal hücre hasarı ve ölümünde önemli bir basamak olduğunu gösterir.

AMPA reseptörlerine bağlı hipereksitabiliteye ek olarak, birçok TBH çalışmasında artmış NMDA reseptör aktivitesine dikkat çekilmiştir. Hücre içi NMDA reseptörünün reaktif oksijen ve nitrojen parçacıkları ile birleşmesi glutamaterjik uyarıdan sonra, başta kalsiyum iyonları olmak üzere ölümcül bir iyon akışına neden olur. Örneğin, nöronlarda nitrik oksit (NO) oluşumu NMDA reseptör aktivitesine bağlıdır. Eksitotoksisite boyunca mitokondri fazla serbest kalsiyumu tutup hücre içi kalsiyum dengesini korumaya çalışır. Mitokondrideki artmış kalsiyum düzeyleri süperoksit iyonunu (O₂⁻) içeren ROT'ların üretimini artırır. Mitokondride oluşan O₂⁻ in NMDA hiperaktivitesi sonucu oluşan NO ile reaksiyonu oldukça reaktif nitratlayıcı türler olan peroksinitritleri (ONOO⁻) oluşturur.³⁶ Deneysel TBH'da artmış ONOO⁻ ölümcül hücre sel süreçler olan aminoasitlerin aromatik halkalarının nitratlanmasına, lipid peroksidasyonuna, ve DNA kırılmalarına neden olur.^{37,38,39}

Travma sonrası NMDA reseptörleri ve nöronal NO oluşumu arasındaki fiziksel ilişkideki düzensizlik beyin hasarının tedavi girişimlerine ümit vermiştir. Reseptör kompleksi ve yapısal proteinler arasındaki etkileşim engellenerek, travmanın uyardığı ONOO⁻ ve NO oluşumu in vitro olarak başarıyla azaltılmıştır.⁴⁰

2. 4. 3. İnflamasyon

SSS'nin dış uyarılara karşı yanıt verebildiği son 20 yıldır düşünülmektedir. Bu zamana kadar beyin dokusu, lenfatik sistemi olmadığı ve kan beyin bariyeri (KBB) hücreler ve çözünmüş maddelere karşı geçirgen olmadığı için "immünolojik açıdan ayrıcalıklı" olarak değerlendirilmekteydi.⁴¹ Yapılan çalışmalar, TBH'dan sonra KBB'den immün hücrelerin özellikle de lökositlerin göçü olduğunu göstermiştir.⁴² "Immünolojik açıdan ayrıcalıklı" olma teorisinin temelinde olan KBB'nin geçirimsizliğinin bozulması, artık travmadan sonraki immünolojik olaylarda kolaylaştırıcı faktör olarak düşünülmekte ve günümüzde iç doku bileşenleri ile devam eden nöroinflamasyon olarak adlandırılmaktadır.⁴³ SSS'nin kalıcı hücreleri olan astrosit ve mikroglia, düşük düzeyde klas 1 ve 2 majör histokompatibilite kompleksleri ekspresyon etmenin yanında sitokin, kemokin ve onların reseptörlerini de sentezleyebilir.⁴¹

TBH, son zamanlarda SSS'nin nöroinflamatuvar bir hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Beyinde erken inflamasyonun göstergesi aktive mikrogliaların, nötrofillerin ve ödemin bulunmasıdır. Mikroglia, immün reaktif denetleyici bir hücre gibi davranır ve patojenlerin tutulması, konakçı savunması ve doku onarımı için gereklidir.⁴⁴ Travmayı takiben mikroglia periferik makrofajdan morfolojik ve immünolojik olarak ayırt edilemez hale gelir.⁴⁵ Sık kullanılan nöroinflamasyon modellerinde mikrogliaların interlökinler ve ROT gibi proinflamatuvar moleküllerin ana kaynağı olduğu bildirilmiştir.⁴⁶ Buna karşılık astrositlerin, anjiogeneze yardım eden büyüme faktörlerini salgılayarak, enerji kaynağı azalmış nörona glutamin ve laktat gibi alternatif enerji kaynakları sağlayarak ve yeni oluşan nöronların farklılaşmasını destekleyerek yardımcı rolü olduğu kabul edilmiştir.⁴⁷ Ne tamamıyla nörotrofik ne de nörotoksik bir hücre olan mikrogliaların sinir büyüme faktörü ailesinin nörotrofinlerinin de kaynağı olduğu gösterilmiştir.⁴⁸ Aynı zamanda astrositlerin glial skar oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir ve nöronların canlılığı ve aksonal rejenerasyonda tartışmalı bir faktördür.⁴⁹

DeneySEL fokal hasarda immün sistemin serebral cevabı tanımlanmışsa da, TBH sonrası ilk 24 saatte nötrofilik infiltrasyon ve 3–5 günde makrofajlarla takviye edilen inflamatuvar sürecin gerçekleşmesi aslında beyin kontüzyonuna bağlıdır.⁵⁰ Buna karşılık deneySEL diffüz aksonal hasarda, sistemik dolaşımdan akut nötrofil cevabı olmadan astrosit ve mikrogliaların immünaktivasyonu ve periferik makrofajların infiltrasyonu gösterilmiştir. Bu immün reaksiyonlardaki farklılık KBB'deki değişik derecelerdeki bozulmalardan ya da kişinin gösterdiği immün yanıtın kaynaklanabilir. Birçok deneySEL TBH araştırması fokal

hasar modellerine odaklanmakla birlikte DAH'daki immün yanıt son yıllarda aydınlanmaya başlamıştır.⁵¹

Çeşitli immün ve immün olmayan hücrelerden sistemik ve intratekal üretilen sitokinler, periferden hematojen hücrelerin takviyesi, serebrovasküler geçirgenliğin artması ve SSS'deki kalıcı hücrelerin aktivasyonunun devam etmesi ile nöroinflamasyona aracılık ederler.⁵² Bu mediatörler yalnızca nöroinflamatuvar yanıtın yayılmasından sorumlu değil aynı zamanda onun varlığının bir göstergesidir. Sitokinler hasarla eş anlamlı değildir. Nöroprotektif ve nörotrofik etkileri gösterilmiş olmakla beraber sinir gelişimi ve normal SSS fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli oldukları da iyi bilinmektedir.⁴¹

İnterlökin 1 (IL-1)'in zararlı etkileri, fokal hasarda mikroglialardan, diffüz hasarda nöronlar ve travmanın erken dönemlerinde açığa çıkan reaktif astrositlerden eksprese edilen IL-1 reseptörü (IL-1R) aracılığı ile dir.^{51,53} IL-1'den kaynaklanan hasar, yalnız sitokinin kendisine bağlı değil daha çok TNF- α , siklooksijenaz-2, fosfolipaz A₂ ve prostaglandinleri içeren diğer proinflamatuvar sitokinleri aktive etmesi, onlarla sinerjistik etki göstermesi ve glutamat aracılı eksitotoksisiteyi artırmasına bağlıdır. TBH'da IL-1 başlıca proinflamatuvar ve nörotoksik molekül olsa da astrositlerdeki nöron büyüme faktörünü uyarması ile nöroprotektif özelliğe de sahiptir.⁵⁴ IL-1 ile devam eden nöroinflamasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. TBH olan hastalardan serebrospinal sıvılarında yüksek IL-1 düzeylerine sahip olanlarda Glaskow Koma Skalası daha düşük bulunmuştur.⁵⁵ TNF- α , IL-1 gibi, TBH çalışmalarında sadece proinflamatuvar bir sitokin olarak düşünülürken, son yıllarda olası nöroprotektif özellikleri ortaya çıkmaya başlamıştır. TNF- α 'nın mikrogliaların üretimini ve hipertrofiye olmalarını arttırdığı, bu hücrel kaynaklardan parakrin etki ile kendi üretimini attırdığı bilinmektedir. Ayrıca özellikle diffüz hasarda önemli olan periferik dolaşımdan lökosit toplanmasını, KBB'nin bozulmasına yol açan proteolitik enzimlerin salınımını ve astrositik yeniden yapılanmanın ve nöronal rejenerasyonun inhibisyonunu destekler.⁵⁶ Fokal hasar modelleri, TNF- α 'nın etkilerinin yayılan özelliğini göstermektedir. Örneğin TNF- α ekspresyonu fokal hasarlı farede kontralateral korteks ve hipokampusta artmış olarak bulunmuştur; kontrollü kortikal çarpma modellerinde ise pik serebral ödem olmadan önce en yüksek düzeyde saptanmıştır.⁵⁷ Buna karşılık diffüz hasar modelleri beyin dokusunda ekspresyon olmadan 24 saat içinde serum TNF- α düzeylerinin arttığını göstermiştir. Bu da diffüz hasarın çok farklı immün yanıtlara neden olduğu tartışmasına yol açmıştır.⁵⁸

İnterlökin-6, nöroinflamasyonda sitokinlerin "dual rolü"ne prototiptir. Periferik ve santral olarak akut faz reaksiyonundaki rolü iyi bilinmektedir ve endotelden nöronlara kadar

geniş bir kaynağa sahiptir.⁵⁹ Spesifik antiinflamatuvar özellikleri, TNF- α 'nın baskılanması ve IL-1RA'nın indüksiyonunu içerir. Fakat nöroprotektif özellikleri nöron büyüme faktörünün üretiminin uyarılmasına, oksidatif stres ve glutamat aracılı toksisiteye karşı savunmayı ve revaskülarizasyonu arttırmasına bağlıdır.⁶⁰ Nöronlardan, astrositlerden ve mikroglialardan IL-6 üretimi SSS'de akut faz reaktanlarının ana kaynağıdır ve astrositlerin aktivasyonları IL-6'ya bağımlıdır.⁶¹ Reaktif astrogliosis, glial fibriler asidik protein eksprese eden astrositlerle belirlenir ve TBH'nın hücreseel yanıtında tartışmalı bir konudur. Literatürde glial skar oluşumunu ve proinflamatuvar sitokin salınımını sürdürdüğü veya bozulmuş KBB'nin onarımına yardım ettiği kabul edilmektedir.⁶² DAH modelinde reaktif astrogliosis, IL-6 mRNA upregülasyonu ile birlikte ilk 2 saat içinde başlar ve travmadan sonra 2 hafta devam eder.⁶⁴ İnterlökin-10 (IL-10) ve transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü beta (TGF- β), immünsüpresif etkileri olan antiinflamatuvar sitokinlerdir ve etkilerini TNF- α , IL-1 ve interferon- γ gibi proinflamatuvar sitokinleri inhibe ederek gösterirler.^{64,43} IL-10, santral nöroinflamasyonu azaltırken politravmalı hastalarda periferik olarak immunosüpresyona yol açar. Multitravmalı hastalarda bu çok önemlidir, çünkü sistemik antiinflamatuvar yanıtlar klinik olarak enfeksiyona yatkınlığı arttırmak gibi sekonder beyin hasarına katkı sağlayabilir. Bunun dışında antiinflamatuvar sitokinin kendisi nöroinflamasyona bağlı sekonder beyin hasarını azaltabilir. Sitokinlerin üretiminin beyin dokusunda artması lokal sonucu iyileştirirken, sistemik olarak üretilmesi genel sonucu kötü etkileyebilmektedir. Bu da intraserebral ve periferik immunolojik olaylar arasındaki ilişkinin dikkat çekici bir özelliğidir. Lökosit iletişimi ve göçündeki rolleri ile bilinen kemokinler, TBH'dan sonra periferik lökositlerin göçünü başlatırlar. Yapılan çalışmalarda kemokinlerin intraserebral üretimi gösterilmiştir.⁶⁵

Kemirgenlerde makrofaj inflamatuvar protein-2 olarak bilinen IL-8, nötrofiller için güçlü bir kemotaktik faktördür ve proteazları indükleyerek sekonder hasara aracılık ettiği bildirilmiştir.⁶⁶ Şiddetli kafa travması geçiren hastalarda ilk 6 saat içinde serebrospinal sıvıda IL-8'in üretiminin arttığı gösterilmiştir. IL-8'in, kemotaksis dışında, KBB disfonksiyonunu ve nöron büyüme faktörünün üretimini uyarmak gibi etkileri de vardır.⁶⁷

Monosit kemoatraktan protein-1 kan kaynaklı monositlerin göçü için çok önemlidir.⁶⁸ Diffüz hasar modelinde monosit kemoatraktan protein-1 proteininin artışı, hasardan sonra 4-16 saat içinde gösterilmiş, ancak immünhistokimyasal inceleme ile monosit/makrofajların perivasküler görünümüne benzer olarak makrofaj inflamatuvar protein-2 ve akut nötrofilik infiltrasyon görülmemiştir.⁵¹ Bu nedenle kemokin salınım şekli nöroinflamasyonun bir

yönüdür ve farklı tip primer beyin hasarı ile ilgili hücrel yanıtı düzenlediği düşünölmektedir.

Günümüzde artık SSS'nin periferik immün infiltrasyona reaktif bir yapı olmadığı ve santral immünoaktivasyonun periferik immünolojik olayları etkilediği düşünölmektedir.

2. 4. 4. Oksidatif Hasar

Oksidatif hasar TBH'da gelişen sekonder hasarın önemli bir bileşenidir (Şekil-2). Beyin dokusu aşağıda sıralanan birçok özelliği nedeni ile oksidatif hasara daha duyarlıdır.

1) Beyin dokusunu oluşturan hücrelerin membranları lipid bakımından diğer organların hücrelerinden daha zengindir.

2) Nöronların membran/sitoplazma oranları diğer hücelere göre daha büyüktür, yani oran membran yönüne doğru kaymıştır.

3) Oksidatif metabolik aktivite oldukça yüksektir.

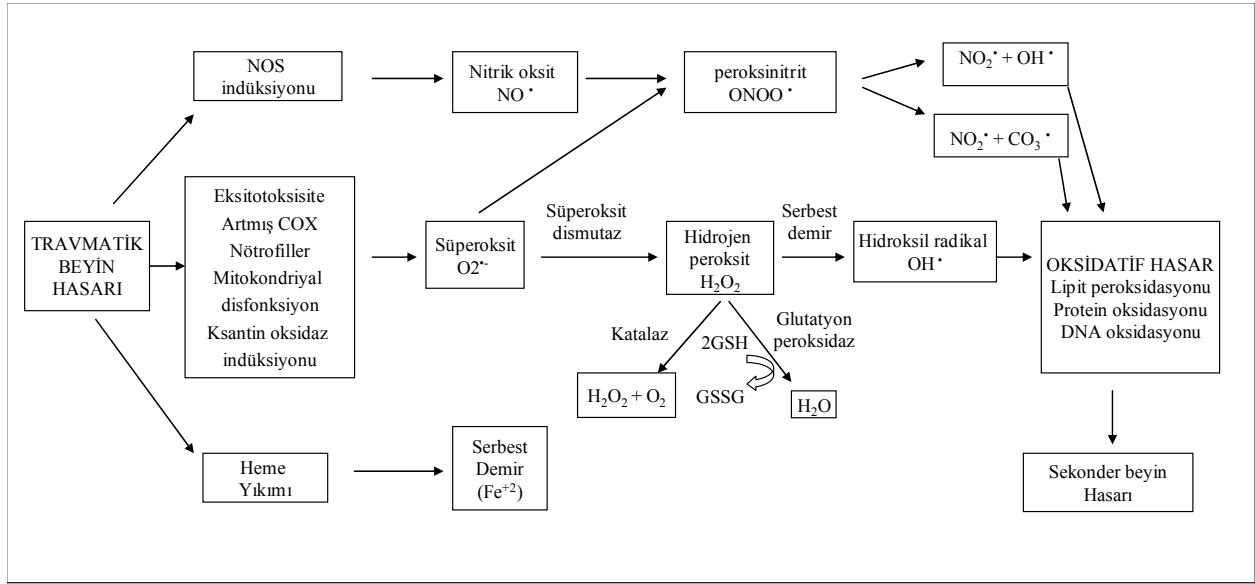
4) Oksidan streten koruyucu enzimler olan antioksidan enzim aktiviteleri düşüktür.

5) Spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla endojen olarak fazla miktarda ROT üretilmektedir. Bunun en iyi örneği dopamin oksidasyonudur.

6) Periferal hasara yatkın olan uzamış akson morfolojisi ile uyumlu nöronlara özgü özellikleri vardır.

7) Nöronların son bölünmesini tamamlamış olması ve dolayısıyla bölünememesi hasara uğrayan hücrenin yerine yenisinin gelememesi sonucunu doğurmaktadır, bu da dokunun hasara daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır.

Bütün bu özellikleri dolayısıyla oksidatif strese diğer doku ve organlardan daha yatkın olan beyin dokusunun korunma ihtiyacı diğer dokulardan daha fazladır.⁶⁸



Şekil-2. TBH'dan sonra oksidatif hasar mekanizmaları.⁷⁰

ROT, bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Oksidatif metabolizmaya genellikle enzimatik taşıyıcılardan elektron akışının belirli hedefine değil de oksijene kayması ile oluşan serbest oksijen radikalleri katılmaktadır. Serbest radikaller $O_2^{\bullet-}$, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^{\bullet}), nitrik oksit (NO^{\bullet}) ve $ONOO^{\bullet}$ gibi reaktif oksijen ve nitrojen türleridir. Hücre içi kalsiyum artışına yol açan glutamata bağlı eksitotoksisite, nitrik oksit sentaz ve ksantin oksidaz gibi birçok endojen enzim ile fosfolipaz A-2-siklooksijenaz yolunu uyarır. Hücre içi kalsiyum artışı aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonu bozar ve süperoksit sızıntısına yol açar.⁷¹

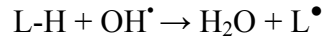
Aktive nötrofiller direk olarak $O_2^{\bullet-}$ ve NO^{\bullet} üretebilirler. Ayrıca ROT'lar birbirleri ile reaksiyona girerek, örneğin $O_2^{\bullet-}$ ve NO^{\bullet} reaksiyonundan $ONOO^{\bullet}$ oluşumu gibi ek ROT'un oluşumuna sebep olurlar.⁷²

ROT reaksiyonlarının düzenlenmesinde geçiş metallerinin kontrolü önemlidir. Hemin yıkım ürünleri, özellikle serbest demir, travmatize beyinde oksidatif stres için önemli kaynaktır. Demir, H_2O_2 ile reaksiyona girerek OH^{\bullet} radikali lipidlerle de alkoksi ve peroksi radikalleri oluşturur (Şekil-2). Bu okside edici türler hücrelerde doku hasarı sonrası eritrositlerden salınan serbest hemoglobin birikimi nedeniyle önemlidirler. H_2O_2 gibi okside edici moleküller hemoglobin ve geçiş metali içeren diğer proteinler ile birleştiğinde ciddi tehdit oluşturmaktadırlar.⁷³

Organizmada herhangi bir nedenle aşırı miktarda üretilen ROT'un nükleik asitler, lipidler, çeşitli proteinler ve polisakkaritler gibi biyomoleküllerle etkileşmesi, hücre ve doku

hasarlarına yol açmakta ve pek çok patolojik olayda önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. Bunların içerisinde oksidatif hücre hasarı bakımından en önemli olanı, membran lipidlerinin oksidasyonudur. LP, fosfolipid, glikolipid, gliserit ve sterollerin yapısında bulunan poliansature yağ asitlerinin ROT etkisiyle alkol, aldehit, hidroksiasit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Organizmada lipid peroksidasyonun gerçekleştiği başlıca yerler yüksek oranda fosfolipid içeren biyomembranlar ve subsellüler organellerdir.⁷⁴

Redoks katalisti olarak görev yapan Fe^{+3} veya Cu^{+2} gibi geçiş metal iyonlarının varlığında, ROT'un hepsi LP'yi başlatabilir. Peroksidasyon, ROT'un, poliansature yağ asidinin metilenik yan zincirinden bir hidrojen atomu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Böylece, yağ asidi zinciri üzerinde karbon merkezli bir lipid radikali oluşur.



Radikal oluşumunu takiben yağ asidi zincirindeki çift bağlar, konjuge dien şeklinde yeniden düzenlendikten sonra, O_2 ile reaksiyona girerek peroksi radikalini oluştururlar. Peroksi radikali diğer bir peroksi radikaliyle birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, bu radikallerin kendilerine komşu yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomlarını çıkartabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri, lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir. Lipid hidroperoksitleri, hem proteinleri veya bazı metal kompleksleri varlığında, siklik peroksitler ya da endoperoksitler üzerinden çeşitli ürünlere yıkılmaktadır. Çoğu biyolojik olarak aktif olan bu ürünler -OH, -OOH, -COOH veya -CHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitleri ile etan ve pentan gibi gazlardır.⁷⁵ Peroksidasyon sırasında oluşan peroksi radikalleri, lipid hidroperoksitler ve bunların yıkım ürünleri, biyomembranlar, subsellüler organeller ve enzimler üzerinde toksik etkilerini gösterirler. Membran permeabilitesini ve mikroviskositesini değiştirirler. Böylece, membranın H^+ ve Ca^{+2} gibi diğer iyonlara karşı geçirgenliği artar ve transmembran iyon gradiyenti bozulduğundan membran potansiyelinde düşme gözlenir. Sonuçta membran akışkanlığı azalır. Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Çünkü enzimler dahil birçok protein yapısında bulunan serbest tiyol (-SH) gruplarını, disüfitlere (S-S) oksitleyerek, bu bileşiklerin aktivite ya da fonksiyonlarının değişmesine neden olurlar. Subsellüler organellerin yapısını ve fonksiyonlarını bozarlar. Mitokondrielerde oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerini değiştirirler, hatta lizozomal hidrolitik enzimler gibi organel içeriklerinin de salınımına yol açarlar.⁷⁶ Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu MDA oluşumuyla sonuçlanmaktadır.

Membran bileşenlerinin (protein, lipid) polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi, intrinsek membran özelliklerini değiştirebilir. MDA ayrıca, nükleer membrandan diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilmekte ve pürin-pirimidin yapılarında modifikasyona ve DNA iplikçiklerinde kopmalara neden olabilmektedir. LP sırasında açığa çıkan ürünlerden olan MDA, konjuge dien, organik hidroperoksit ve pentan gibi ürünlerin düzeyleri kantitatif olarak ölçülebilmekte ve böylece ROT ile indüklenen peroksidasyonun derecesi belirlenebilmektedir.⁷²

2. 4. 5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, üç farklı nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından arjininden sentezlenir ve SSS'de birçok fonksiyon gösterir. Endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) kalsiyum/kalmodilin bağımlı olarak NO sentezlerler. Fakat indüklenebilir NOS (iNOS) birçok patolojik durumda kalsiyumdan bağımsız olarak NO sentezler. nNOS, özellikle arteria serebri medianın beslediği alanlarda bulunur ve iskemi ve travmada uyarılır. eNOS endotel hücrelerinde bulunur ve iskemide vazodilatasyona yol açtığı için diğerlerinden farklı olarak nöroprotektif etkilidir.^{77,78} VEGF üretimi, yeni kan damarlarının oluşumuna yol açan eNOS ekspresyonunu uyarabilir.⁷⁹ eNOS tarafından üretilmiş NO'nun neden olduğu presinaptik sinyallerdeki değişiklikler nöronun esnekliği ve iyileşmesi için önemlidir. Ayrıca eNOS, nöronların apoptotik ölümünü cGMP'ye bağlı bir mekanizma ile engelleyebilirler.⁸⁰ TBH'dan sonraki etkileri benzer olmakla beraber farklı mekanizmalarla da nöroprotektif etkiler gösterebilir. Çünkü NO küçük bir moleküldür ve çevre dokulara geçip parakrin etki ile kapillerlerde platelet agregasyonunu ve parankime lökosit infiltrasyonunu inhibe edebilir.⁸¹ iNOS travma dahil birçok stresli durumda uyarılır ve makrofajlar, nötrofiller ve çeşitli hücrelerden salınabilir. TBH TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olur. TNF- α ve IL-1 β , nükleer faktör kappa B (NF- κ B) yoluyla iNOS mRNA transkripsiyonunun en önemli iki uyarandır. iNOS tarafından üretilen NO, iskemi ve travmada nöronlarda mitokondriyal ve hücrel disfonksiyona yol açar ve sekonder hasarı artırır. Oluşan NO, O₂⁻ gibi ROT ile reaksiyona girip daha güçlü oksidan bir molekül olan ONOO⁻'i oluşturur ve nöronlarda apoptozis ve nekroza yol açar.⁸²

TBH'dan sonra birkaç dakika içinde eNOS ve nNOS pik yapar fakat kısa sürede aktivite bazal değerinin %50'sine düşer ve yaklaşık 7 gün böyle devam eder. Bunlara karşıt

olarak, iNOS ekspresyonu beyin hasarından sonra belirgin artış gösterir ve ilk 1–2 günde NO pik yapar. Bu nedenle TBH'dan sonra iNOS'un farmakolojik ve genetik inhibisyonu önemlidir.⁸³

2. 4. 6. Endotelinler

Endotelinler, vazokonstriktif etkileri ile özellikle iskemide doku hasarını artırıcı etkilere sahiptir. Son zamanlarda, kapalı kafa travmasında endotelin düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Endotelin A reseptör selektif antagonistlerinin iskemi ve kapalı kafa travmasında koruyucu etkileri gözlenmiş ve nörotravma endotelin B reseptörlerinde gecikmiş olarak selektif kayba yol açmıştır.⁸⁴

2. 4. 7. Apoptozis

Apoptozis, beyin hasarından sonra iskemi ve travmadaki hücrelölümün %50'sinden ve her durumda da bu süreci başlatan hücre içi ve hücre dışı sinyallerden sorumlu olabilir. Memeli hücrelerinde başlıca iki apoptozis yolu tanımlanmıştır; Fas/TNF-R reseptör yolu ve mitokondriyal yol. TBH'daki apoptotik süreç için kesin mekanizmalar tam belli değildir. Genel olarak, mitokondri iç zarından sitozole salınan sitokrom c, mitokondriye bağlı apoptozis yolunu başlatır. Sitozolda sitokrom c, apoptozis aktive edici faktör-1, kaspaz-9 ve deoksiadenozintrifosfata bağlanır ve ardı sıra meydana gelen; kaspaz-3 aktivasyonuna, daha sonra poli(ADP-riboz) polimeraz gibi substratından ayrılmasına, endonükleazların aktivasyonuna ve son olarak DNA'nın yıkılmasına yol açar. Bu nedenle mitokondriden sitokrom c salınımına yol açan mekanizmaların aydınlatılması akut kafa travmasında apoptozisin anlaşılmasında önemlidir. Aksonlarda mitokondriyal sitokrom c salınımı Buki ve ark. tarafından tanımlanmıştır.⁸⁵ Ayrıca beyin hasarında apoptotik ölüme yol açan mekanizmalar NF-κB ve p53'e bağlı yolları ve bcl ailesinin indüklenebilir proapoptotik üyelerinin aktivasyonunu içerir. Bu faktörlerin uyarılması da kaspazları aktive eder. Kaspaz 3, DNA yıkımına ve hücre ölümüne yol açan, DNA'yı parçalayan endonükleazları, enerji tüketen DNA tamir enzimlerini ve poli (ADP-riboz) polimerazı aktive eder.⁸⁶

2. 5. Travmatik Beyin Hasarında İkincil Hasardan Koruyucu Mekanizmalar (Nöroproteksiyon)

2. 5. 1. Endojen Koruyucu Mekanizmalar

Perilezyonel alanlardan salınan mediatörlerin hepsi hücre hasarına aracılık etmez. Bazı mediatörler iskemik ve travmatik hasardan sonra nöron iyileşmesine katkıda bulunabilirler.

1. Antiinflamatuvar Sitokinler

Yapılan son çalışmalarda, IL-10 gibi bazı sitokinler iskemik hasarda inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak koruyucu etki göstermişlerdir. IL-1RA, TNF- α bağlayıcı protein ve IL-18 bağlayıcı protein gibi bağlayıcı proteinler, reseptörü ya da sitokinin kendisini bağlayarak proinflamatuvar sitokinlerin etkilerini antagonize ederler.⁸⁶

2. Antioksidan mekanizmalar

Fizyolojik durumlarda oksidatif hasardan koruyucu birçok endojen antioksidan bileşen tanımlanmıştır (Şekil-2). Antioksidan sistem, enzimler ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar olarak iki sınıfta değerlendirilebilir. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.) $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'e dönüşümünü katalizler. Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.19) ve katalaz (EC 1.11.1.6) moleküler oksijen ve su oluşturarak H_2O_2 'i temizler. Bunlara destek olan metallothioneinler ve ısı şok proteinleri vardır. Metallothioneinler geçiş metallere redoks aktivitelerini azaltan ve antioksidan özellikleri olan bir grup proteindir.⁸⁷ Serbest radikal tutucular, genel olarak düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar olarak bilinirler ve beyinde de bulunurlar. Bunlar glutasyon, melatonin, ürik asit ve histidinle ilişkili moleküller gibi endojen ve tokoferoller (vitamin E), askorbik asit ve lipoik asit gibi diyetle alınan eksojen moleküllerdir. TBH'dan sonra antioksidan savunma mekanizmaları bozulur ve serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonu, protein ve DNA oksidasyonu ile hücre hasarı ve ölüme yol açabilir. Beyin, yüksek yağ asidi içeriği nedeniyle ve total vücut oksijen içeriğinin büyük oranını kullandığı için oksidatif hasara çok duyarlıdır.⁸⁸

Serum ve plazmada bulunan değişik antioksidan moleküllerin konsantrasyonları farklı metodlarla ölçülmüştür, fakat bu moleküllerin tek tek ölçülmesi zaman alıcı, pahalı ve daha komplike teknikler gerektirmektedirler. Bu nedenle farklı antioksidanların ayrı ayrı ölçülmesi

pratik değildir ve antioksidan etkileri birbirlerini etkilemektedir. Bu nedenle Erel ve ark.'nın geliştirdiği yöntemde olduğu gibi örnekteki total antioksidan kapasitenin (TAK) ölçülmesine yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, bir radikal oluşturulup bu radikale karşı örnekteki antioksidan aktivite ölçülmektedir. En çok kullanılan kolorimetrik yöntemler, renksiz bir molekül olan ABTS'nin [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonyl asit)] kullanıldığı yöntemlerdir. ABTS okside olduğunda mavi-yeşil renkli ABTS⁺ oluşur. Renkli ABTS⁺ okside olabilecek başka bir molekül ile reaksiyona girdiğinde de orijinal renksiz haline indirgenir. Bu özellik ABTS kullanan yöntemlerin temelini oluşturmaktadır.⁸⁹

İnsanlarda SOD'nın 3 izoenzimi bulunur. Bakır-çinko SOD (SOD1) hücrelerin daha çok sitoplazma ve lizozomlarında bulunur ve TBH'da en çok çalışılan SOD izoformudur. Artmış SOD1 aktivitesi hasarlı beyinde nöroproteksiyon ile ilişkilidir.⁹⁰

İkinci SOD izoenzimi manganez-SOD (SOD2), daha çok mitokondride bulunur. SOD2 defektli farelerde, TBH'dan sonra kortikal lezyonda fazla nekrotik hücre ölümüyle ilişkili mitokondriyal sitokrom c'nin artmış salınımı gösterilmiştir.⁸⁵ Hücre dışı SOD (SOD3), serebral iskemi modellerinde fazla salınımının yararlı olduğu görülen üçüncü SOD izoenzimidir fakat TBH'da çalışılmamıştır.⁹¹ Yapılan çalışmalarda, deneysel TBH modellerinde, KBB'den SOD geçişini ve etkinliğini artıran SOD'nin farmakolojik formlarının verilmesi sonucunda ortaya çıkan bazı etkileri olduğu gösterilmiştir. Polietilen glikol bağlı-SOD'un (PEG-SOD, pegorgotein) hasar sonrası motor hasarları düzelttiği fakat denge ve mekansal hafıza üzerine etkisi olmadığı görülmüştür.⁹² Diğer bir form olan lesitinize-SOD ödemi azaltıp yaşam süresini artırmaktadır. İlginç olarak, polietilen glikol bağlı-SOD bilişsel fonksiyonları etkilemezken, lesitinize-SOD mekansal hafıza ile ilgili olan hipokampal CA3 bölgesinde nöron ölümünü azaltır.⁹³

GPx aktivitesi, beyinde katalazdan yedi kat daha fazladır. GPx, redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) oksidasyonu sırasında peroksitleri toksik olmayan formuna dönüştürür. Glutasyon redüktaz da GSSG'yi GSH'a tekrar redükte eder. Travmadan sonra 3. saatte düşüş gösteren GSH düzeylerinin 96 saat boyunca düşük kaldığı bildirilmiştir. GSSG oluşumu ile düşen GSH düzeyleri apoptotik nöron ölümü ile ilişkilendirilmiştir. Travmadan sonra düşen GSH/GSSG oranı sistemdeki oksidatif ve/veya nitrozatif yükün göstergesidir.⁹⁴ GPx, erişkin beyinde travmadan sonra hemen artarken immatür beyinde bu artış görülmez.⁹⁵ Travmaya yanıtta immatür beynin GPx artışındaki yetersizliği, immatür beynin hasara olan savunmasızlığında önemli rol oynuyor olabilir. İskemi/hipoksi modelinde artmış GPx, sonuçları iyileştirmiş ve bu antioksidan enziminin pediatrik TBH için potansiyel tedavi ajanı olabileceği konusunda ümit vermektedir.⁹⁶

TBH'da antioksidan özelliğe sahip başka ajanlar da çalışılmıştır. Bunlar nitron spin tuzakları, 21-aminosteroid bileşikler (genellikle tirilazad mesilat), siklooksijenaz inhibitörleri (ibuprofen, indometasin), nitrik oksit sentaz inhibitörleri, tokoferoller, nitroksit radikalleri, melatonin ve nonpsikoaktif kanabinoid deksanabinoldür.⁷⁰ Melatonin hidroksil radikal ve peroksil radikal gibi ROT'ları yakalayabilmesi ile antioksidan özelliklere sahiptir. Melatoninin endojen sentezlenen glutatyon ve mannitolden sırasıyla 5 ve 14 kat daha fazla, genelde ilk antioksidanlardan olarak bilinen vitamin E ile eşdeğer ya da daha fazla antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca birçok in vitro ve in vivo çalışmada melatoninin nöronal hasarı azaltıcı ve nöronal dokuyu koruyucu etkileri gösterilmiştir.⁹⁷

3. Gonad hormonları

Östrojen ve progesteron, inme ve TBH'da büyük olasılıkla antioksidan mekanizmaları artırarak, eksitotoksisteyi ve inflamasyonu azaltarak, demyelinizasyonu uyararak nöroprotektif ve nörodejeneratif etkiler göstermektedir.⁹⁸ Beyinde insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve östrojen uyarıları arasındaki etkileşimin nöron hasarına karşı nöron yaşamını desteklediği gösterilmiştir.⁹⁹

4. Büyüme Faktörleri

Beyin hasarından sonra çok erken dönemde sinir büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, glia kaynaklı büyüme faktörü, bazik ve asidik fibroblastik büyüme faktörleri ve TGF- β süper ailesinin üyeleri gibi birçok büyüme faktörü uyarılır. Örneğin TBH'dan sonra geç zamanlarda verilse bile fibroblastik büyüme faktörlerinin beyinde koruyucu etkisi gösterilmiştir. Tüm bu büyüme faktörlerinin dışarıdan verilmesi nöroprotektif etki göstermiştir. Bu nedenle endojen uyarılmalarının da nöroprotektif etkili olabileceği düşünülmektedir.¹⁰⁰ VEGF, hastalıkta ve sağlıkta anjiogenezde anahtar role sahip bir büyüme faktörüdür. Başlıca beş izoformu vardır. VEGF izoformları, birçok durumda farklı patolojik süreçlerde farklı ekspresyona sahiptir. VEGF ailesinin en önemli reseptörleri Feline sarkom virus benzeri tirozin kinaz reseptörü (Flt-1) ve fetal karaciğer kinaz reseptörü (Flk-1) veya VEGFR-2 reseptörleridir. Flk-1 A, C, D ve E VEGF izoformlarına bağlanır ve mitojenik, anjiogenik ve permeabiliteyi arttırıcı etkilere aracılık ederek endotel hücrelerinin damarsal yataklara dönüşümünde kritik rol alır. VEGFR-2 nörofilin-1'in koreseptörü olarak bilinir. Bu iki reseptörün birlikte ekspresyonu VEGF'in VEGFR-2'ye bağlanmasını ve VEGF'e bağımlı

kemotaksisi artırır. Patolojik durumlarda VEGFR-2, fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)-bağımlı sinyal yolu ile antiapoptotik etki gösterir ve VEGF uyarısı ile oluşan endotel dokusunun yaşamını desteklerken bazı patolojik durumlarda KBB'den sızıntıyı artırarak vasküler permeabiliteyi değiştirir. Rat spesifik bir protein olan endotel bariyer antijen gibi çeşitli KBB belirteçleri matür, sağlam ve tam fonksiyon gösteren beyinlerin küçük damarlarının endotel hücre bazal membranından eksprese edilir. Bu antijenin fonksiyonu tam olarak bilinmese de ensefalit, beyin travması ve beyine Klostridyum Perfringens toksininin verilmesi gibi bazı patolojik durumlarda permeabilite artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. VEGF, diğer büyüme faktörlerinden farklı olarak beyinde iki yönlü etkiye sahiptir. Akut ve kronik hasardaki etkileri ya da hipoksi veya inflamasyondaki etkileri değişebilmektedir.¹⁰¹

VEGF, hipoksi ile transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel indüksiyona uğrayan bir anjiogenezis ve vasküler geçirgenliğe etki eden büyüme faktörüdür. Hipoksi durumunda beyini de içeren çeşitli dokulardaki anjiogenezis ile ilişkilidir ve serebral iskemiye vasküler yanıtta önemlidir. Çünkü iskemi beyinde VEGF salınımını uyararak yeni serebral kan damarı oluşumunu tetikler.¹⁰² Serebral iskemiden sonra beyin yüzeyine topikal VEGF uygulanması infarkt alanını azaltmış,¹⁰³ intravenöz VEGF verilmesi nörolojik sonuçları iyileştirmiştir¹⁰⁴ ve intraventriküler olarak anti-VEGF ab uygulaması infarkt alanını arttırmıştır.¹⁰⁵ Bu bulgular VEGF'in nöroprotektif etkisi ile uyumludur fakat bu etkiden anjiogenezis mi sorumludur tam belli değildir. Çünkü VEGF'e yanıt olarak oluşan damarlar normalden fazla sızıntılıdır ve beyin ödemi artırıp iskemi sonuçlarını kötüleştirmektedir. Zhang ve ark. VEGF'in dual rolüne ilk kanıt olarak bildirdikleri çalışmalarında, deneysel inme modelinde iskemik ratlara 48 saat sonra rhVEGF₁₆₅ verdiklerinde beyinde mikrovasküler perfüzyonu artırıp fonksiyonel nörolojik iyileşme sağlamıştır. Fakat inme oluşturulduktan 1 saat sonra verdiklerinde KBB bariyeri sızıntısını arttırmıştır.¹⁰⁴ VEGF, NO salınımını uyararak vasküler permeabiliteyi artırır. VEGF, KBB'i bozarak SSS'deki immün yanıtları değiştirir. SSS'deki antijenlerin kandan gelen immün medyatörler ile karşılaşmasına neden olur ve beyin immün korumalı durumunun bozulmasına neden olur. Beyinde normalden fazla VEGF üretilmesi, intersellüler adezyon molekülü-1 ve major histokompatibilite kompleks klas 1 ve 2 üretimini artırır.¹⁰⁶

VEGF nöronlar üzerinde direk etki gösterir ve aksonal büyümeyi uyarır. VEGF'in hipokampal nöron kültüründe glutamat ve NMDA toksisitesinde hücre ölümünü inhibe etmesi VEGF'in direk nöronal koruyucu etki mekanizmasını desteklemektedir.¹⁰⁷ Son zamanlarda VEGF erişkin beyinde nörogenezisi geliştiren bir faktör olarak düşünülmektedir. Ayrıca VEGF nöronal prekürsörlere direk mitojenik etki göstermektedir. Böylece iskemik beyinde

VEGF ekspresyonu iskeminin indüklediği nörogenezise katkıda bulunabilir ve sonuçları iyileştirebilir.¹⁰²

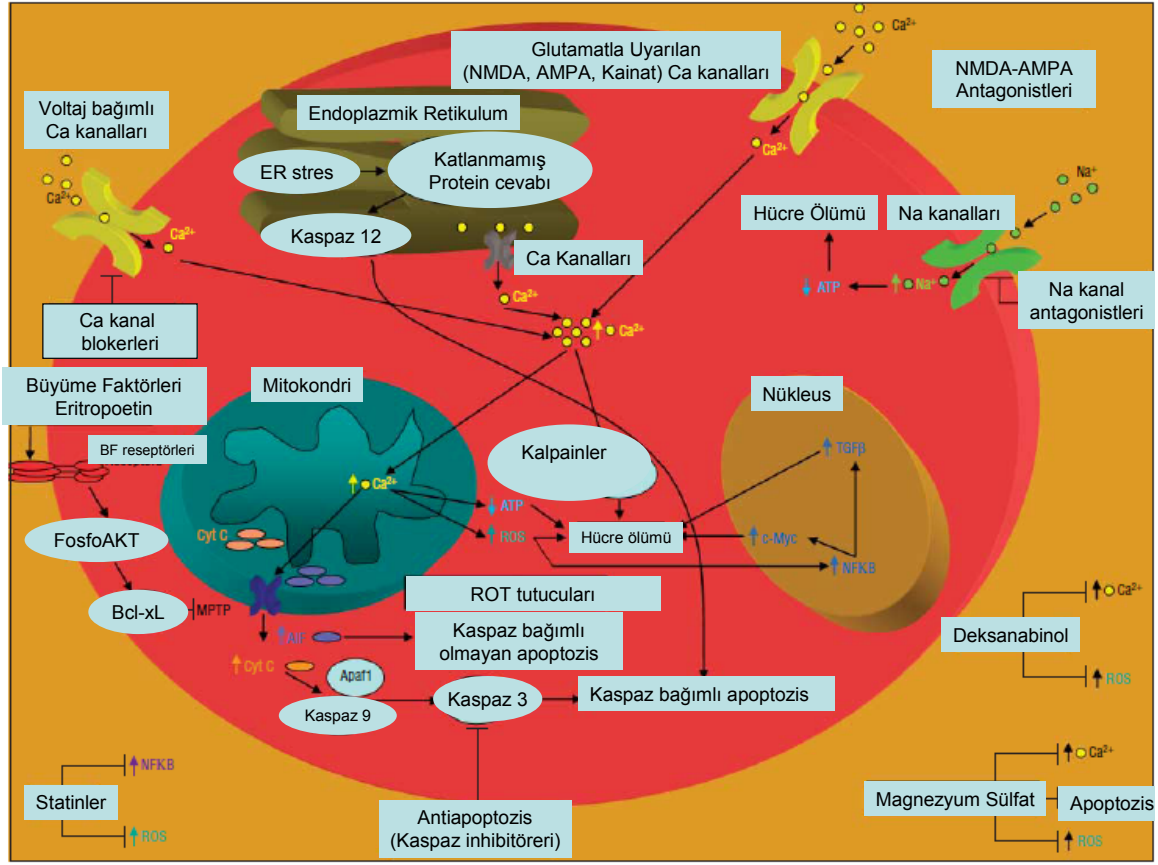
2. 5. 2. Travmatik Beyin Hasarında Nöroprotektif Tedavi

Kafa travmasında, sekonder biyokimyasal hasarı ve hücre ölümünü sınırlayabilmede farmakolojik ajanların (Tablo–1) etkileri (Şekil–3) birçok hayvan modelinde çalışılmıştır. Fakat hayvan modelinde ümit veren nöroprotektif tedavi protokolleri insanlarda uygulandığında yeterince başarı elde edilememiştir. Bazı kavramsal ve metodolojik konular hayvan deneylerinin kliniğe aktarılmasında zorlukları artırmaktadır.¹⁰⁸ Bunlar yetersiz hayvan modelleri, yetersiz ilaç dağılımı ve hayvan çalışmalarında sürelerin çok kısa olması ya da uygun olmaması olabilir. Ayrıca bu çalışmaların yalnız bir mekanizmayı hedef alıyor olması en önemli neden olarak görülmektedir. Örneğin eksitotoksik aktivite bloke edilse de apoptotik süreç nedeniyle hücre ölümü devam edebilir. Çünkü Şekil–1’de görüldüğü gibi travmatik beyin hasarında birçok mekanizma rol oynamaktadır. Son yıllarda, nöroprotektif ajanların gelecekteki klinik çalışmaları için farklı deneysel yaklaşımlar ve değişik klinik metodlar dikkatlice yeniden gözden geçirilmektedir.⁸⁴

Tablo–1. Kafa travmasında yapılan çalışmalar.¹⁰⁸

	Hayvan deneyleri	Klinik çalışmalar
Anti inflamatuvar	+	ÇY
NMDA antagonistleri	+++	—
AMPA antagonistleri	++	ÇY
Dexanabinol	++	—
Na kanal blokerleri	++	ÇY
TRH	+++	ÇY
Büyüme faktörleri	++	ÇY
Glukokortikoidler	+	—
Kafeinol	+	ÇY
Opioid antagonistler	++	ÇY
Anti apoptozis	++	ÇY
Serbest radikal tutucular	+	—
Eritropoiein	++	ÇY
Kalsiyum kanal blokerleri	+	—
Magnezyum sülfat	++	—
Statinler	++	ÇY

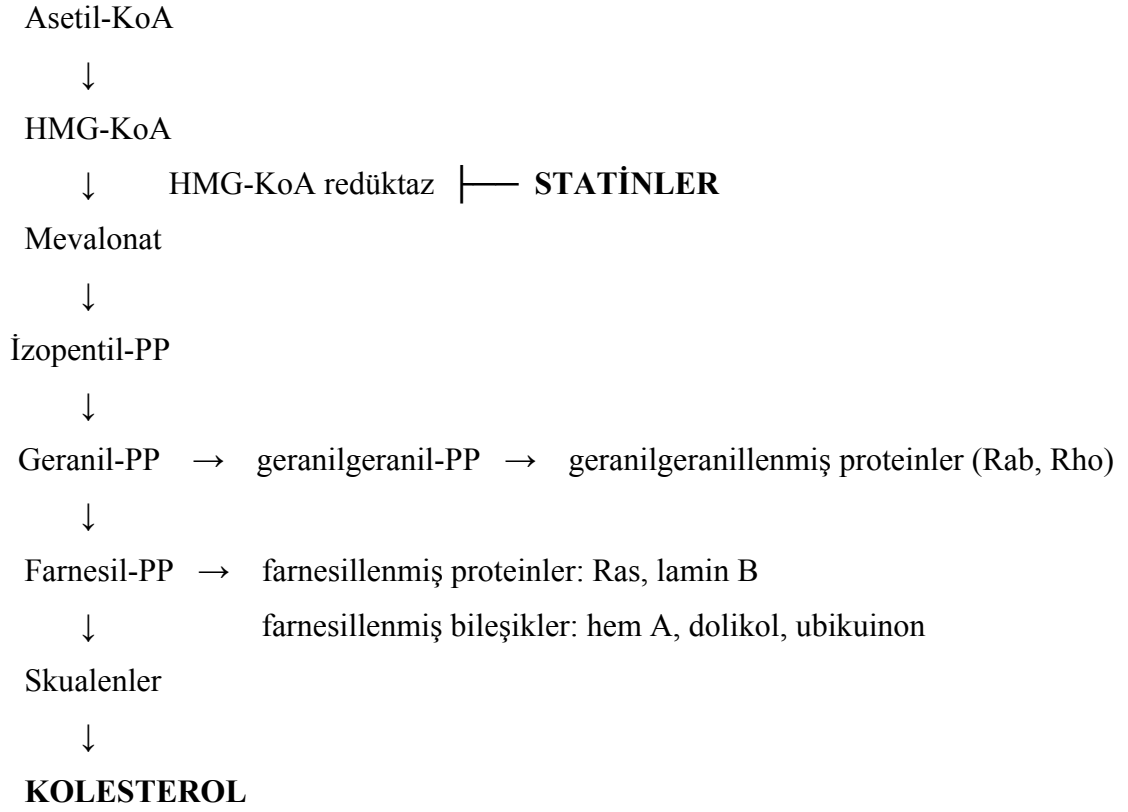
— koruyucu etkisi yok, + az koruma, ++ orta koruma, +++ güçlü koruma, ÇY çalışma yok.



Şekil-3. Kafa travmasında çalışılan farmakolojik ajanların etki mekanizmaları.¹⁰⁸

1. Statinler

Statinler, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG-KoA redüktaz enziminin kompetitif inhibitörleridir. Kolesterol düşürücü etkilerini, hepatik LDL ekspresyonunu ve kolesterol klirensini artırarak gösterirler. Ancak son yıllarda statinlerin, kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız çok yönlü etkileri olduğu ortaya çıkmıştır.^{109,110} HMG-KoA redüktaz enzimi, koenzim olarak NADPH kullanarak HMG-KoA'yı mevalonata indirger. Mevalonat sentezinin inhibisyonu, kolesterol ve farnesilpirofosfat (FPP) ve geranil pirofosfat (GPP) gibi izoprenoid ara ürünlerinde önemli miktarda azalmaya neden olur (Şekil-4). Azalmış FPP ve GPP, izoprenoid oluşumunu azaltır ve posttranslasyonel protein izoprenilasyonu etkilenir. Bu yolla %0,5-1 proteinin modifiye edildiği düşünülmektedir. Bu nedenle statinlerin etkilerinin, kolesterol düşürücü etkilerinden çok daha fazla olabileceği düşünülmektedir.¹¹¹



Şekil-4. Mevalonat yolu

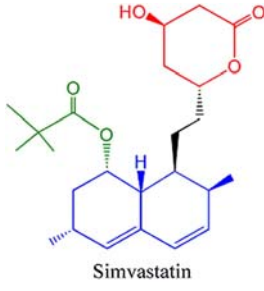
İzoprenoidler birçok proteinin posttranslasyonel modifikasyonu için önemli lipid parçacıklarıdır. Ras ve Rho gibi GTPaz ailesinin üyeleri prenilasyon ile posttranslasyonel modifikasyon için en önemli substratlardır. Diğerleri heme-A, nükleer laminler, heterodimerik G proteinlerin gamma alt birimleri ve diğer Rab, Rac, Ral ve Rap gibi küçük guanozin trifosfat (GTP)-bağlı Ras-benzeri proteinlerdir. Statinlerin ana hedefleri olan Ras ve Rho, inaktif GDP-bağlı ve aktif GTP-bağlı yapılar arasında dönen küçük GTP-bağlı proteinlerdir. Endotel hücrelerinde, sitoplazmadan plazma membranına Ras translokasyonu farnesilasyona bağlıdır. Rho translokasyonu için de geranilgeranilasyonu gerekmektedir. Bu ikisinin izoprenilasyonunun inhibisyonu ile statinler sitoplazmada bu proteinlerin inaktif formlarının birikmesine neden olurlar. Statinlerin kardiyovasküler fonksiyonları iyileştirmedeki yararlı etkileri kolesterol düzeyleri düşmeden ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni olarak, platelet aktivasyonunda, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunda ve inflamatuvar sitokin salınımında azalma ile sonuçlanan eNOS ekspresyon ve aktivitesinin artması ileri sürülmektedir.^{112,113} Küçük G-proteinleri Rho ve Rac, eNOS ekspresyonunu ve NO oluşumunu etkilemektedir. Rho eNOS ekspresyonunu azaltırken, Rac NAD(P)H-oksidadz aktivasyonuna ve süperoksit

oluşumuna katkıda bulunur. Statinler, geranilgeranilasyonun inhibisyonu ile Rho ve Rac GTP-azları inhibe ederler ve eNOS upregülasyonuna yol açarlar.¹¹⁴

Hasarlı beyin dokusunda statinlerin etkisine dair birçok potansiyel mekanizma vardır. Hayvan deneylerinde, kapalı kafa travmasında, HMG-KoA redüktaz inhibitörleri serebral ödem ve sekonder nöronal hasara katkıda bulunan glial aktivasyonu ve inflamatuvar cevabı azaltır.² Statinler eNOS upregülasyonu ve endotelial fonksiyon stabilizasyonu ile serebral hipoperfüzyonu azaltabilir.¹¹⁵ Hayvan deneyi verilerine göre akut etkilerine ek olarak hasar sonrasında uzun dönem etkileri nöronal plastisite, sinaptogenezis ve anjiogenezisin artması olarak sayılabilir.^{116,117}

Bunların dışında statinler PI3K'ı içeren olaylar dizisini aktive ederler ve eNOS aktivitesini direk olarak artırır.¹¹⁸ NO, antitrombotik, antiinflamatuvar ve antiproliferatif özelliklere sahiptir. Yetersiz konsantrasyonu vasküler relaksasyonun bozulmasına, platelet agregasyonuna, vasküler düz kas proliferasyonunun, endotele lökosit adezyonunun ve kan basıncının artmasına neden olur.⁷⁸ Sonuçta, endotel kaynaklı NO damar duvarını koruyucudur. Toksik miktarda NO üreten enzim olan iNOS'un aktivasyonu, serebral iskemi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, tümörler ve travma gibi SSS hastalıklarında yer almıştır.¹¹⁹ Astrositler, sitokinler ve TNF- α 'yı içeren proinflamatuvar mediatörlere yanıt olarak iNOS üretirler. Astrosit ve makrofaj kaynaklı iNOS, oksidatif yan ürün olan peroksinitrit ile birlikte, iskemide yapısal proteinlerin oksidasyonu ile nöron ölümüne katkıda bulunabilir. Lovastatin ile rat astrosit, mikroglia ve makrofajlarında iNOS indüksiyonu ve sonrasında NO üretimi azaltılabilir ve bu da statinlerin akut iskemi sonrasındaki sekonder hasar ve inflamatuvar yanıtın bu bileşenini baskılayabileceği tezini destekler.¹²⁰ Endotel hücreleri L-tipi Ca^{+2} kanallarından yoksun olmasına karşın, bazı izoprenoidlerin vasküler düz kas hücrelerinde L-tipi Ca^{+2} kanallarını inhibe ettiği bulunmuştur. Bu inhibisyon, statinlerin uyardığı Ca^{+2} artışında HMG-KoA redüktaz bağımlı mekanizmanın bir açıklaması olabilir. Lorkowska ve ark.'a göre pravastatin dışındaki atorvastatin, simvastatin, serivastatin ve lovastatin endotelde ani Ca^{+2} artışını uyarır. Statinlerin HMG-KoA redüktaz inhibisyonuna bağlı gözükmeyen endoteldeki bu farklı etkileri, hücre içi NO ve PGI₂'deki ani artış ile ilişkili olabilir.¹²¹

Klinik uygulamada, dokuz statin test edilmiştir. Mevastatin ilk olarak Penisilyum Sitrinumdan'dan izole edilmiştir. Lovastatin, Aspergillus terreus'tan izole edilen diğer doğal statindir. Pravastatin ve simvastatin lovastatinin kimyasal türevleridir. Diğer sentetik statinler atorvastatin, fluvastatin, serivastatin, pitavastatin ve rozuvastatindir.



Şekil-5. Simvastatinin moleküler yapısı

Statinlerin doku dağılımı ve metabolizmaları farklıdır. Şekil-5'te moleküler yapısı görülen ve HMG-KoA redüktaz inhibitörü olan simvastatin, lovastatinin metil analogudur ve *Aspergillus terreus*un fermentasyon ürünüdür. Molekül formülü $C_{25}H_{38}O_5$ ve moleküler ağırlığı 428,57 gramdır. Suda çözünmez fakat kloroform, metanol ve etanolde çözünür. Simvastatin asitin inaktif formu olan simvastatin karaciğerde metabolize edilir ve bilier sistem ile atılır.

Simvastatin gibi lipofilik statinler, primer olarak karaciğeri hedefleyen pravastatin ve rosuvastatin gibi hidrofilik statinlerden daha etkili bir şekilde pasif difüzyonla endotel hücrelerine girerler. Statinler serum proteinlerine bağlandıkları için biyoyararlanımları sınırlıdır.¹²² Simvastatin, fazla lipofilik özelliği nedeniyle KBB'ni en iyi geçebilen statindir ve yarı ömrü 4 saattir.¹²³

2. 6. Travma Modelleri

DeneySEL kafa travması ile TBH oluşturulmasının amacı, klinik travmadaki fazların veya patolojik olayların aynısının patoloji ve/veya tedaviyi gösterecek şekilde oluşturulmasıdır. Özel bir modelin seçilmesi çalışmanın hedefine göre belirlenmelidir. Hedefe bakmaksızın, seçilen model aşağıdaki kriterleri karşılamalıdır:

- 1) Hasarı oluşturacak mekanik etki kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmalıdır;
- 2) Oluşturulan hasar kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve insanda oluşan hasara benzer olmalıdır;
- 3) Hasarın sonuçları mekanik kuvvetle ilişkili olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak veya davranış parametreleri ile ölçülebilmelidir,

4) Hasarı oluşturan mekanik kuvvetin yoğunluğu ile sonucun şiddeti tahmin edilebilmelidir.

Farklı düşünceler olmasına karşın, küçük boyutları ve maliyetinin daha az olması nedeniyle tekrarlayan ölçümler sağladığı için insan TBH modelinin oluşturulmasında daha çok rodentler tercih edilmiştir.¹⁴ Ancak tekrarlanabilir ve standart hale getirilmiş deneysel çalışmalarda yapılan travmalarda, örneğin gerçek hayatta rastladığımız araç içi trafik kazasında veya yüksekten düşmede oluşan kafa travması dışı omurga, batin, toraks travması gibi diğer travmalar ve kan kaybı gibi etmenler deneye katılamamakta, bu durum da deneyin gerçeklerle olan benzerliğini tartışılır hale getirmektedir. Bu nedenle birçok travma modeli tanımlanmış ve gerçeğe yakın olanı saptanmaya çalışılmıştır. Tanımlanan bu travma modelleri arasında santral ve lateral sıvı çarpma, sert cisimle yaralama, yüksekten ağırlık düşürme (akselerasyon), enjeksiyon, lokal gerilim, soğuk hasar ve penetran yaralanmalar sayılabilir.³

Akselerasyon modelinde, anestezi altında bir süngerin üstüne yerleştirilip tespit edilen deneğin parietal bölgesinde orta hat üzerine yapılan insizyon sonrası konan bir çelik disk üzerine bilinen yükseklikten, bilinen bir ağırlık düşürülür (Resim-1). İki çeşit akselerasyon modeli vardır. Birinde kranyum açılarak travma direk olarak beyine uygulanır, diğerinde kranyum sağlam bırakılarak travma sağlam kafatası üzerine uygulanır. Kafaya ağırlık düşürerek (akselerasyon) travma oluşturma modeli ilk defa 1981 yılında Feenay ve ark. tarafından uygulanmıştır. Bu modelde insanda kafa travması sonrası sıklıkla gözlenen serebral ödem, intrakraniyal hipertansiyon ve serebral kan akımı değişiklikleri daha iyi oluşturulmaktadır. Ayrıca bu modelde ağır kafa travması düzeyine belirgin beyin sapı hasarı oluşturulmadan ulaşılır.¹²⁴ Çarpmadan hemen sonra kan basıncında geçici hafif artış olur ve serebral kan akımının otoregülasyonu bozulmaz.¹²⁵

Santral ve lateral sıvı çarpma modelinde genellikle bregma ve lambda arasında sol parietal kemik veya temporal kemik üzerinde 4 mm kraniektomi yapılır. Direk olarak dura üzerine, alttaki beyin dokusunda deformasyon oluşturacak basınçta enjektörle steril izotonik salin enjekte edilir. Serebral kan akımı ve KBB'i değişiklikleri yanında metabolik değişiklikler ve koma ile karakterizedir. Santral sıvı çarpma modelinde özellikle beyin sapında aksonal hasar, lateral sıvı çarpma modelinde ise hipokampal hasar gösterilmiştir.

Sert cisimle yaralama modelinde, çeşitli derecelerde koma ile beraber çarpma yerinin altında parasagittal kortekste çeşitli büyüklükte kontüzyon oluşabilir. Enjeksiyon modellerinde kan veya diğer sıvılarla kafa içinde hematoma oluştururken, hematoma altında geniş bir alanda nekroz izlenmiştir. Lokal gerilim modelinde, yük veya emme doğrudan kortekse veya duraya uygulanarak kontüzyon oluşturulur. Soğuk hasar modelinde yapılan çalışmalarda ise hasar

bölgesinin merkezinde, küçük bir alanda nekroz, etrafında ise vazojenik ödem geliştiği ve ödemin gelişme süresinin insanda görülen kafa travmasıyla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Penetran yaralanmada kesici aletlerle beyinde defekt oluşturulur.

Bu çalışmada, insanda kafa travması sonrası sıklıkla gözlenen serebral ödem, intrakranyal hipertansiyon ve serebral kan akımı değişikliklerinin izlenmesi, ağır diffüz beyin hasarı düzeyine belirgin beyin sapı hasarı oluşturulmadan ulaşılması nedeniyle 1994 yılında Marmarou ve ark. tarafından tanımlanan akselerasyon travma modeli kullanılmıştır. Bu yöntemde anestezi altında bir süngerin üstüne yerleştirilip tespit edilen sıçanın lambda ve bregma arasında ortahat insizyonu sonrası 3 mm yüksekliğinde 10 mm çapında çelik disk yerleştirilir ve 2 m yüksekten 450 g ağırlık çelik diskin üzerine bırakılarak travma oluşturulur. Yöntemin diffüz beyin ödemine yol açtığı gösterilmiştir.¹²⁶ Kafa travması modellerinin çeşitli özelliklerini değerlendiren ve karşılaştıran Gennarelli, akselerasyon modelinin, sıvı-çarpma modeliyle (kranium açılarak beyin üzerine basınçlı sıvı sıkarak oluşturulur) birlikte insanda oluşan serebral kontüzyonu en iyi taklit eden modeller olduğunu, yaygın hasar açısından bakıldığında ise en iyi yöntemin akselerasyon modeli olduğunu belirtmiştir.⁴

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında ve Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3. 1. Kullanılan Gereçler

3. 1. 1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada ağırlıkları 300 ve 330 g arasında değişen, daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış toplam 40 adet erişkin Wistar-albino erkek rat kullanıldı. Ratlar Düzce Üniversitesi, Deney Araştırma ve Uygulama laboratuvarından sağlandı. Ratlar çalışma gününden önce, en az 4 gün standart koşullarda (~22°C, 12 sa aydınlık/12 sa karanlık siklusunda) tutuldu ve standart rat yemi ve çeşme suyuyla beslendi. Travma gruplarına travma oluşturulması ve deneyin devamı Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Üretim Laboratuvarında gerçekleştirildi. Planlanan bu çalışma için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul Alt Kurulu'ndan 07. 03. 2008 tarih ve 100/2 sayılı etik kurul onayı alındı.

Biyokimyasal analizler için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarında bulunan araçlar ve kimyasal malzemeler kullanıldı.

3. 1. 2. Kullanılan Araçlar

Santrifüj (Eppendorf Centrifuge, 5415R)

Homojenizatör (Heidolph Instruments GmbH 8 Co.K6 Schwabach, Germany DIAX 900)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201V, Japan)

Mikroplate okuyucu (Biorad, 680, microplate reader)

Terazi (AND, HR-120, Japan)

Vortex (Nüve, NM110)

pH metre (Orion Research Inc. USA, 710A)

3. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Simvastatin (ZOCOR®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., U.S.A)

Ketaminhidroklorür (Ketalar- Parke Davis / Eczacıbaşı)

KH₂PO₄ (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Na₂HPO₄ (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

KCl (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

EDTA (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Fosforik asit (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

n-butanol (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH)

Triklorasetik asit (RdH Laborchemikalien GmbH&Ko)

1. 1. 3. 3. tetraetoksiopropan (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany)

3. 2. Uygulanan Yöntemler

3. 2. 1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Anestezi öncesi tüm denekler tartıldı ve intraperitoneal (i.p.) olarak 50 mg/kg dozda ketaminhidroklorür ile anestezi uygulandı. Kornea refleksi ve kuyruk sıkma yöntemiyle anestezi derinliği kontrol edildikten sonra denekler monitörize edilerek travma öncesi (0. saat) solunum, nabız ve rektal ısıları gibi fizyolojik değerleri kaydedildi.

Deney hayvanları rastgele olarak her grupta 10 denek bulunan 4 gruba ayrıldı:

GRUP 1 (Sham grubu, S): Bu gruptaki deneklere kafa travması oluşturulmadan ve tedavi verilmeden, fizyolojik parametreleri kaydedildikten sonra ketamin anestezi altında intrakardiyak kan ve sakrifiye edildikten sonra beyin doku örnekleri alındı

GRUP 2 (Travma grubu, T): Bu gruptaki deneklere kafa travması oluşturuldu ve 24 saat sonra ketamin anestezisi altında intrakardiyak kan ve sakrifiye edildikten sonra beyin doku örnekleri alındı.

GRUP 3 (Travma+çözücü grubu, TÇ): Bu gruptaki deneklere kafa travması oluşturulduktan sonra 3 saat sonra çözücü [etanol: saline (1:2)] i.p. olarak verildi ve 24 saat

sonra ketamin anestezisi altında intrakardiyak kan ve sakrifiye edildikten sonra beyin doku örnekleri alındı.¹²⁷

GRUP 4 (Travma+simvastatin grubu, TS): Kafa travması oluşturulduktan 3 saat sonra simvastatin 1 mg/kg dozunda i.p. olarak verildi ve 24 saat sonra ketamin anestezisi altında intrakardiyak kan ve sakrifiye edildikten sonra beyin doku örnekleri alındı.¹²⁷

Travma oluşturulması planlanan gruplarda denekler yüz üstü yatırıldı. Orta hatta bregma ve lambdoid sütür görülecek şekilde cilt insizyonu yapıldı. Periost, sütürler önde ve arkada tümü ile ortaya konacak şekilde yana sıyrıldı. Orta hatta koronal ve lambdoid sutürler arasına 10 mm çapında 3 mm kalınlığında çelik disk konuldu (Resim-1). Daha sonra ratlar 12X12X43 cm boyutlarındaki sünger bir zemin üzerine prone pozisyonda yerleştirildi ve Marmarou'nun tarif ettiği travma düzeneği pozisyonlandı. İç çapı 19mm, dış çapı 25 mm olan bir tüpün içinden 450 g ağırlığındaki çelik çubuk 2 metre yükseklikten bırakılarak kapalı kafa travması oluşturuldu (Resim-2).



Resim-1. Orta hatta koronal ve lambdoid sütürler arasına 10 mm çapında 3 mm kalınlığında çelik disk konulması.



Resim-2: Marmarou ve arkadaşları tarafından tarif edilen akselerasyon travma modeli.¹²⁶

Denekler buldukları grupta uygulanacak tedavi protokolüne göre travmadan sonraki 3. saatte; travma+çözücü grubuna (TÇ) çözücü [etanol: SF (1:2)]; travma+simvastatin grubuna ise (TS) simvastatin absolut etanol ile çözüldükten ve SF ile final etanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde dilüe edildikten sonra 1mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandı.¹²⁷

Travma sırasında ve takip sürecinde ölen ratlar çalışma dışı bırakıldı. 24. saatte sağ kalan tüm denekler sırt üstü yatırılarak ketaminhidroklorür (50mg/kg/i.p.) anestezisi altında travma sonrası fizyolojik parametreleri kaydedildi ve biyokimyasal analizler için intrakardiyak kan örnekleri alındı (Resim-3). Daha sonra denekler dekapite edildi ve atravmatik olmasına dikkat edilerek boyundan başlayan diseksiyon ile beyin ve beyin sapı bir bütün halinde kafatasından çıkarıldı (Resim- 4).



Resim-3. Deneklerin sırt üstü yatırılarak intrakardiyak kan alınması.



Resim-4: Deneklerin dekapitasyon ile beyin ve beyin sapının bir bütün halinde çıkarılması sonrası elde edilen doku örneği (S grubundan).

Çıkarılan beyin dokuları hemen soğuk izotonik serum fizyolojik ile yıkandı ve koronal sütür hizasından ikiye bölündü. Ön kısım histopatolojik inceleme için %10 tamponlanmış formalin içinde fikse edildi. Arka kısım biyokimyasal incelemeler için parçalara ayrıldı, alüminyum folyoya sarılarak sıvı azot içinde donduruldu ve biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Alınan kan örnekleri, 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve ayrılan serumlar porsiyonlanarak biyokimyasal analiz yapılınca kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3. 2. 2. Histopatolojik İnceleme

%10'luk tamponlu formalin ile tespit edilen dokulardan hipokampal ve pons-serebellum seviyelerinden alınan örneklerden hazırlanan aksiyel kesitler, hematoksilin eozin (H&E) yöntemiyle boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olimpus BX-40 model) ile deney grupları hakkında bilgisi olmayan bir patolog tarafından değerlendirildi.

Histopatolojik değerlendirmede kanama, ödem, nöronal hasar (pembe iskemik nöronlar-perinöral vakuolizasyon), retraksiyon ball-diffüz aksonal hasar, vasküler konjesyon varlığı ve yaygınlığı değişken olarak alındı. Skorlama 3 puan üzerinden yapıldı; O: İzlenmedi, 1: Hafif derecede izlendi, 2: Orta derecede izlendi, 3:Yoğun izlendi şeklinde değerlendirildi.

Kanama varlığı; serbest eritrositlerin parankim ve ventrikülde bulunup bulunmadığına göre, kanamanın yaygınlığı ise: Kanama izlenmemesi: Skor-0, mikroskopta 20 büyütme alanında kanamanın %10'un altında olması Skor- 1: Hafif derecede izlendi, %10-50 arasında olması Skor-2: Orta derecede izlendi, %50'nin üzerinde olması Skor-3: Yoğun izlendi şeklinde değerlendirildi.

Ödem varlığı; parankimde hücrelerin arasının açılarak mikrokistik alanların oluşmasına göre, ödem yaygınlığı ise: ödem izlenmemesi: Skor-0, mikroskopta 20 büyütme alanında ödemin %10'un altında olması Skor-1: Hafif derecede izlendi, %10-50 arasında olması Skor-2: Orta derecede izlendi, %50'nin üzerinde olması Skor-3:Yoğun izlendi şeklinde değerlendirildi.

Nöronal hasar (pembe iskemik nöronlar-perinöral vakuolizasyon) varlığı: Nöronal hasar nöronların sitoplazmasında eozinofilik yoğun boyanma ve perinöronal vakuolizasyon bakılarak değerlendirildi. Nöronal hasar yaygınlığı: Nöronlarda hasar izlenmemesi: Skor- O; Hafif derecede hasar (%0-25 nöronda izlenmesi): Skor-1; orta derecede hasar (% 26-50

nöronda izlenmesi): Skor-2; yoğun hasar (%51-100 nöronda izlenmesi): Skor-3 olarak değerlendirildi.

Retraksiyon ball-DAH varlığı: H&E boyalı preparatlarda eozinofilik elonge veya oval yapılar değerlendirildi. Retraksiyon ball-DAH varlığı: Hasar izlenmemesi: Skor-0; hafif derecede hasar (%0-25 hücrede retraksiyon ball izlenmesi): Skor-1; orta derecede hasar (%26-50 hücrede retraksiyon ball izlenmesi): Skor-2; yoğun hasar (%51-100 hücrede retraksiyon ball izlenmesi): Skor-3 olarak değerlendirildi.

Vasküler konjesyon varlığı: Konjesyon izlenmemesi: Skor-0, mikroskopta 20 büyütme alanında konjesyonun %10'un altında damarlarda olması: Skor-1: Hafif derecede izlendi, %10-50 arasında damarda olması Skor-2: Orta derecede izlendi, %50'nin üzerinde damarda olması Skor-3: Yoğun izlendi şeklinde değerlendirildi.

3. 2. 3. Biyokimyasal Analiz

Deneklerden elde edilen serum örneklerinde total kolesterol (TK), düşük dansiteli kolesterol (LDL-K), yüksek dansiteli kolesterol (HDL-K), protein, MDA, TAK ve VEGF konsantrasyonları ölçüldü. Beyin doku örneklerinden hazırlanan homojenatlarda ise protein, MDA, TAK, VEGF, NO düzeyleri ve SOD aktivitesi çalışıldı.

1. Serum TK, HDL-K ve LDL-K Ölçümü

Serumda TK, LDL-K ve HDL-K düzeyleri, ticari kitler kullanılarak (Abbott Diagnostics, Japan, sırasıyla lot no: 71011HW00, 62154M200, 71018HW00) Architect C8000 (Abbott Diagnostics, Japan) klinik kimya analiz cihazında ölçüldü.

TK düzeyleri enzimatik-kolorimetrik yöntemle ölçüldü.

a) Reaktifler

Kolesterol oksidaz	>200 U/L
Kolesterol esteraz	>500 U/L
Peroksidaz(horseradish)	>300 U/L
4-aminoantipirin	0,25 mmol/L
HBA	10 mmol/L

b) Deneyin yapılışı

Serum kolesterol esterleri, kolesterol esteraz ile enzimatik olarak serbest kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidroliz edilir. Serbest kolesterolden, kolesterol oksidaz ile kolest-4-en-3-on ve H₂O₂ oluşur. H₂O₂'nin hidroksibenzoik asit ve 4-aminoantipirin ile birleşerek oluşturduğu rengin absorbansı spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda ölçülür.

Kit katoloğunda, yöntemin minimum saptama limiti: 5,0 mg/dL, intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri %0,8 (n:80), inter-assay (farklı günlerde) CV değeri %0,4 (n=80) olarak verilmiştir.

Serumda HDL-K ölçümünde, homojen direkt enzimatik-kolorimetrik yöntem kullanıldı.

a) Reaktifler

R1	kolesterol oksidaz (E.Coli)	<1,000 U/L
	Peroksidaz (horseradish)	<1,300 ppg U/L
	N, N-bis (4-sülfobütil)-m-toluidin-disodyum)(DSBmT)	<1,0 mmol/L
	Akseleratör	<1,0 mmol/L
	Askorbik oksidaz (curcubita sp.)	<3,000 U/L
R2	kolesterol esteraz (pseudomonas sp.)	<1,500 U/L
	4-aminoantipirin	<%0,1
	Deterjan	<%2,0

b) Deneyin yapılışı

İlk basamakta, HDL-K dışı nonesterifiye kolesterol, kolesterol oksidaz ile reaksiyona girerek H₂O₂ oluşturur. H₂O₂, DSBmT ile peroksidaz reaksiyonundan renksiz bir ürüne dönüşür.

İkinci basamakta, HDL-K'nın, kolesterol esteraz ve kromojenik bir bağlayıcı ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 604 ve 700 nm dalga boyunda ölçülür.

Kit katoloğunda Yöntemin minimum saptama limiti: 2,5 mg/dL, intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri %1,7 (n=80), inter-assay (farklı günlerde) CV değeri %1,1 (n=80) olarak verilmiştir.

Serumda LDL-K ölçümünde homojen direkt enzimatik-kolorimetrik yöntem kullanıldı.

a) Reaktifler

R1	MES tamponu (pH 6,3)	
	kolesterol oksidaz (Cellulomonas sp.)	<1,500 U/L
	kolesterol esteraz (pseudomonas sp.)	<1,500 U/L
	Peroksidaz (turp)	<1,300 ppg U/L
	4-aminoantipirin	<%0,01
	Askorbik oksidaz (curcubita sp.)	<3,000 U/L
	Deterjan 1	<%1,0
	Koruyucu madde	
R2	MES tamponu (pH 6,3)	
	Deterjan 2	<%1,0
	N, N-bis (4-sülfobütil)-m-toluidin-disodyum)(DSBmT)	<1,0 mmol/L
	Koruyucu madde	

b) Deneyin yapılışı

İlk basamakta kullanılan deterjan (R1) ile LDL-K dışı kolesterolerin çözünmesi sağlanır. Serbest bırakılan kolesterol, kolesterol oksidaz ve kolesterol esteraz tarafından renk oluşturmayan bir reaksiyonda tüketilir.

İkinci basamakta kullanılan deterjan (R2) ile çözünen LDL-K ve kromojen arasındaki reaksiyon sonucu oluşan renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 548 ve 660 nm dalga boyunda ölçülür.

Kit katoloğunda, yöntemin minimum saptama limiti 1,0 mg/dL, inter-assay (farklı günlerde) CV değeri %2,2 (n=20), intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri %1,1 (n=20) olarak verilmiştir.

2. Beyin Dokusu ve Serum MDA Düzeyi Ölçümü

Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA düzeyi, deneklerin serum ve doku örneklerinde 1.1.3.3-tetraethoksiopropan'ın standart olarak kullanıldığı tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile belirlendi. Yöntemin temel prensibi, MDA'nın TBA ile reaksiyona girerek 520 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır.

Serumda MDA düzeyi Yoshioka ve ark. tarafından geliştirilen yöntem ile manuel olarak ölçüldü.¹²⁸

a) Reaktifler

- 1. 1. 3. 3. tetraetoksipropan
- Triklorasetikasit : %20
- TBA: %0.06
- n-butanol

b) Deneyin yapılışı

- 0,5 mL serum 2,5 mL triklorasetikasit ve 1 mL TBA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra 30 dk. kaynar su banyosunda tutuldu.
- Tüpler hızla soğutulduktan sonra 4 mL n-butanol eklendi ve organik faz 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek ayrıldı.
- Süpernatanın absorbands değeri spektrofotometrede distile su körüne karşı 532 nm dalga boyunda ölçüldü.

Doku MDA düzeyi ölçümü için Mihara ve Uchiyama M. tarafından geliştirilen metod kullanıldı.¹²⁹

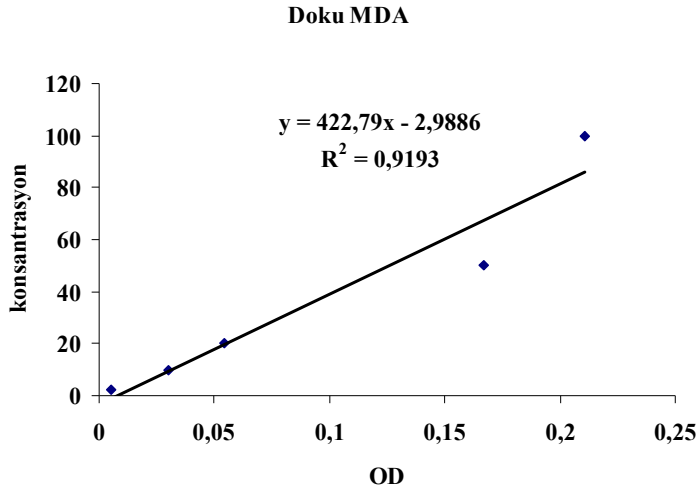
a) Reaktifler

- 1. 1. 3. 3. tetraetoksipropan
- KCL: % 1.15
- TBA: % 0.06
- Fosforik asit : % 1
- n-butanol

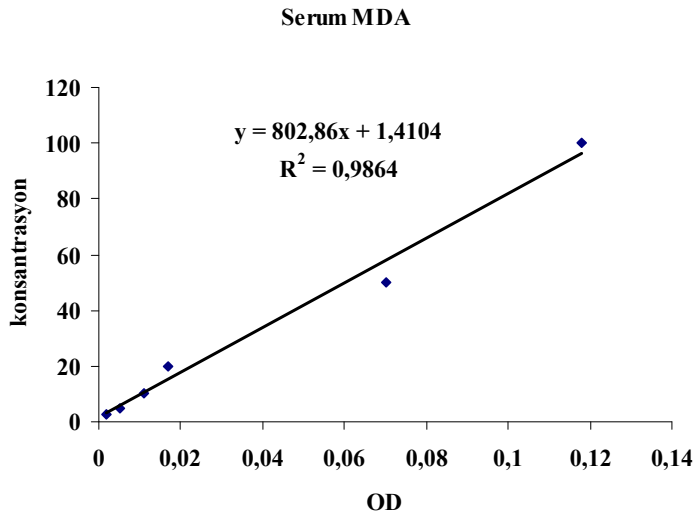
b) Deneyin yapılışı

- Elde edilen beyin doku örneklerinin bir bölümü tartılarak 1:9 (a/v) oranında % 1,15 KCl içeren 50 mM soğuk potasyum fosfat tamponu (pH 7,4) içinde homojenize edildi.
- 0,5 mL homojenat 3 mL fosforik asit ve 1 mL TBA solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra 45 dk. kaynayan su banyosunda tutuldu.
- Tüpler hızla soğutulduktan sonra 4 mL n-butanol eklendi ve organik faz 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek ayrıldı.
- Süpernatanın absorbandsı distile su körüne karşı, spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda ölçüldü.

Standart olarak 1. 1. 3. 3. tetraetoksipropan kullanılarak, 0.5, 1, 10, 20, 50, 100 nmol/mL konsantrasyonlarında hazırlanan standart serilerin absorbanslarından doku (Şekil-6) ve serum (Şekil-7) örnekleri için standart eğriler çizildi ve MDA düzeyi hesaplandı. Sonuçlar dokuda nmol/mg protein, serumda ise nmol/mL olarak verildi.



Şekil-6: Doku MDA standart eğrisi.



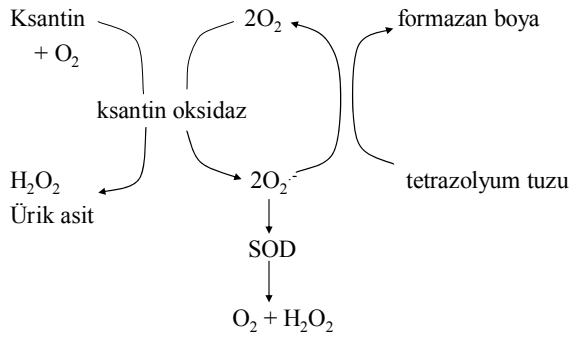
Şekil-7: Serum MDA standart eğrisi.

3. Beyin dokusunda SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

Beyin dokusunda SOD (EC 1.15.1.1.) enzim aktivitesi Cayman kitleri kullanılarak (Cayman Inc, Ann Arbor, MI, USA, katalog no: 706002) kolorimetrik yöntemle manuel olarak ölçüldü.¹³⁰

SOD'un üç izoenziminin (Cu/Zn, Mn, FeSOD) ölçülebildiği yöntemin prensibi, ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki nitroblue tetrazoliumu indirgeyerek renkli formazonları oluşturur. Bu kompleks 450 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin bulunmadığı veya aktivitenin düşük olduğu ortamda bu indirgeme meydana gelir ve mavi-mor renk oluşur.

Kör (enzim aktivitesi bulunmayan), standart ve örnek kuyucuklarının absorbans değerleri mikropate okuyucuda ölçüldü. Nitroblue tetrazolium redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi bir SOD ünitesi olarak kabul edildiğinden %50 inhibisyon hesabı yapıldı.



a) Reaktifler

- SOD çalışma tamponu (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0,1mM dietilenetriamin pentaasetikası, 0,1mM hipoksantin)
- Örnek tamponu: (50mM Tris-HCl, pH 8.0)
- Radikal tutucu (tetrazolium tuzu)
- Standart, tampon (50mM Tris-HCl, pH=8,0)
- Ksantin oksidaz
- SOD standart.

b) Deneyin yapılışı

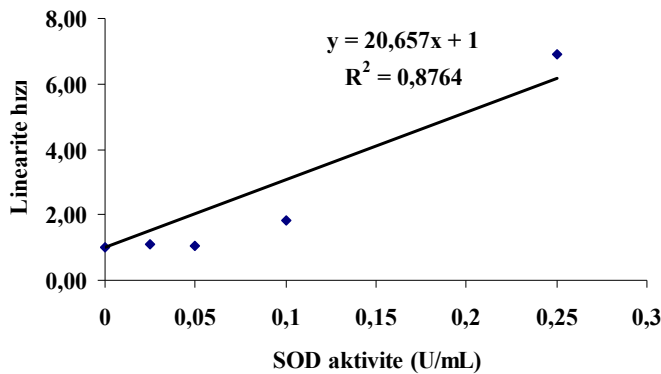
- Elde edilen beyin dokusu örneklerinin bir bölümü 1:9 (a/v) oranında 50 mM soğuk potasyum fosfat tamponunda (pH 7,4) ve buzlu su banyosu içinde homojenize edildi. Homojenat +4 °C'de 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı.
- Kör, standart ve örnek kuyucuklarına 200 µL radikal tutucu pipetlendi.
- Köre 10 µL örnek tamponu, standarta 10 µL standart ve örneklere de 10 µL homojenat eklendi.
- Tüm kuyucuklara hızlıca 20 µL ksantin oksidaz eklenerek reaksiyon başlatıldı.
- Plate kapatılarak 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Absorbans değerleri mikropate okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Absorbansların belirlenmesi için tüm ölçülen absorbanslardan körün absorbansı çıkartıldı ve diğer standartlar ile doku örneklerinin absorbansları standart A'nın (içinde SOD aktivitesi bulunmayan, kör) absorbansına bölünerek linearite hızları hesaplandı.

Örneğin; Standart A için linearite hızları = Ab_{StdA} / Ab_{StdA} ,

Doku örnekleri için linearite hızları = $Ab_{örnek} / Ab_{StdA}$

Standartların linearite hızları kullanılarak çizilen standart eğriden (Şekil-8) elde edilen formül ile SOD enzim aktivitesi hesaplandı ve sonuçlar U/mg protein olarak verildi.



Şekil-8. SOD standart eğrisi.

$$\text{SOD (U/mL)} = \left(\frac{\text{örnek linearite hızları} - y\text{-kesişim}}{\text{Eğim}} \right) \left(\frac{0,23 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right) \times \text{dilüsyon faktörü}$$

Kit kataloğunda, yöntemin minimum saptama aralığı 0,025 – 0,25 U/mL, inter-assay (farklı günlerde) CV değeri %3,7 (n=60), intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri %3,2 (n=60) olarak verilmiştir.

4. Beyin Dokusu ve Serumda Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

TAK, Rel Assay kitleri kullanılarak (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp San. ve Tic Ltd Şti, Türkiye, lot no: RL002). Erel ve ark. tarafından geliştirilen yöntem ile çalışıldı.¹³¹

Yöntemin prensibi, örnekte bulunan antioksidanların mavi-yeşil renkli ABTS⁺ [2, 2'-azino-bis (3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonik asit) radikalini renksiz ABTS formuna dönüştürmesi esasına dayanır. Spektrofotometrede 660 nm dalga boyundaki absorbans değişimi total antioksidan düzeyi ile ilişkilidir. Standart olarak, E vitamini analogu olan ve geleneksel ismi ile Trolox Equivalent olarak bilinen stabil antioksidan standart solüsyonu kullanıldı ve sonuçlar serumda mmolTroloxEquiv./L, dokuda mmolTroloxEquiv./mg protein olarak verildi.

a) Reaktifler:

- Reaktif 1: 0,4 mol/L asetat tampon solüsyonu, pH 5,8
- Reaktif 2: 30 mmol/L asetat tampon solüsyonu, pH 3.6 (10 mmol/L ABTS içerir)
- Standart 1: 0,0 mmolTrolox Equiv./L TAK
- Standart 2: 1,5 mmolTrolox Equiv./L TAK

b) Deneyin yapılışı:

- Beyin doku örneklerinden 50mM soğuk potasyum fosfat tamponu içinde (1:9, a/v) hazırlanan homojenatın santrifüj edilmesi ile elde edilen süpernatantlar kullanıldı.
- 50µL örnek 800µL reaktif 1 ile karıştırıldı.
- 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede ilk absorbanslar okundu.
- 125 µL reaktif 2 eklendi.
- 660 nm dalga boyunda ikinci absorbanslar okundu.

Hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı:

TAS = (Δ Abs standart 1 - Δ Abs örnek) / (Δ Abs standart 1 - Δ Abs standart 2) x standart 2 değeri

Δ Abs standart 1= İkinci Abs standart 1 – birinci Abs standart 1

Δ Abs standart 2= İkinci Abs standart 2 – birinci Abs standart 2

Δ Abs örnek= İkinci Abs örnek – birinci Abs örnek

5. Beyin Dokusu ve Serumda VEGF Ölçümü

Serum ve beyin dokusunda VEGF düzeyleri, RayBiotech kitleri kullanılarak (Rat VEGF ELISA kit, RayBiotech, Inc, Norcross, GA, katalog no: ELR-VEGF-001) enzim bağlı immünoassay yöntemi ile absorbans değerleri mikropate okuyucuda okutularak manuel olarak ölçüldü.

a) Reaktifler:

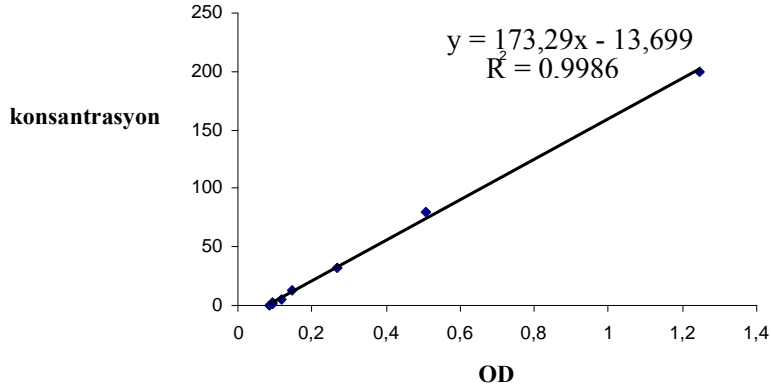
- Konsantre yıkama tamponu
- Standartlar
- Dilüent A (0,09 sodyum azid)
- Dilüent B
- Saptama antikoru (biotinile anti-rat VEGF)
- Konsantre HRP-streptavidin
- TMB tek basamaklı substrat reaktifi (tampon içinde 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin)
- Stop solüsyonu

b) Deneyin yapılışı:

- Beyin doku örneklerinden 50 mM soğuk potasyum fosfat tamponunda (1:9, a/v) hazırlanan homojenatın santrifüj edilmesi ile elde edilen supernatanlar kullanıldı.
- Çalışmada rat VEGF antijenine spesifik antikorlarla kaplı kuyucuklara standartlar ve örnekler pipetlenerek örnekteki VEGF'in antikorlara bağlanması sağlandı.
- Kuyucuklar yıkandıktan sonra biotinile anti-rat VEGF antikorlar eklendi. Bağlanmayan biotinile antikorlar yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara HRP-konjuge streptavidin eklendi.
- Kuyucuklar tekrar yıkandı ve TMB substrat solüsyonu eklenerek VEGF miktarı ile doğru orantılı olarak renk oluşumu gözlemlendi.

- Son olarak eklenen stop solüsyonu rengi maviden sarıya değiştirdi ve oluşan renkli çözeltinin absorbansı mikropate okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

200 pg/mL VEGF standartından hazırlanan standart serilerin absorbansları kullanılarak standart eğri (Şekil-9) çizildi ve VEGF düzeyi hesaplandı. Sonuçlar serumda pg/mL ve dokuda pg/mg protein olarak verildi.

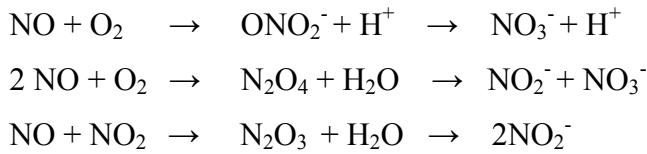


Şekil-9. VEGF standart eğrisi.

Kit katoloğunda, yöntemin minimum saptama limiti < 2pg/mL, inter-assay (farklı günlerde) CV değeri <%12, intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri <%12 olarak verilmiştir.

6. Beyin Dokusunda NO Ölçümü

NO canlı organizmada katıldığı reaksiyonlar ile nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) son ürünlerini oluşturmaktadır. Bu iki son ürünün oranları değişkendir. Bu nedenle total NO üretiminin en iyi göstergesi NO₂⁻ ve NO₃⁻'ün birlikte ölçülmesidir.



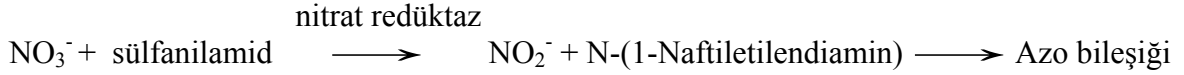
Çalışmamızda beyin dokusunda NO konsantrasyonu, Griess reaksiyonu kullanılarak, nitrat redüktaz ile NO'nin indirgenmesi ile oluşan nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) düzeyleri kolorimetrik yöntemle (Cayman Inc. Ann Arbor, MI, USA, kit katalog no:780001) ölçüldü.¹³²

a) Reaktifler

- Çalışma tamponu
- Nitrat redüktaz enzim
- Nitrat redüktaz kofaktör (NADPH)
- Nitrat standart
- Griess reaktifi 1 (sülfanilamid)
- Griess reaktifi 2 (NO_2^- + N-(1-Naftiletildiamin))

b) Deneyin yapılışı

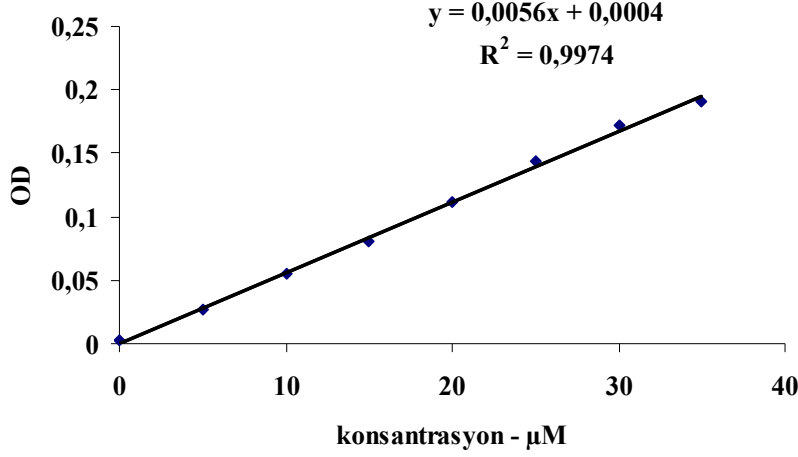
Birinci basamakta nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite çevrildikten sonra ikinci basamakta Griess reaktifi eklenmesi ile nitrit 540 nm dalga boyunda absorbans veren mor renkli azo bileşiğine dönüşür.



Çalışmada;

- Köre 200 μL çalışma tamponu, standarta 40 μL standart ve örneğe 40 μL örnek pipetlendi.
- Daha sonra tüm kuyucuklara sırasıyla 10 μL enzim kofaktör (NADPH) ve nitrat redüktaz eklendi.
- Plate kapatılarak oda sıcaklığında 3 saat bekletildi.
- Tüm kuyucuklara 50 μL Griess reaktifi 1 ve ardından hızlıca Griess reaktifi 2 eklendi.
- Oda sıcaklığında 10 dk bekledikten sonra 540 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorbans değeri ölçüldü.

200 μM NO içeren stok solüsyondan hazırlanan standart serinin absorbans değerlerinden çizilen standart eğriden (Şekil-10) elde edilen formül kullanılarak NO konsantrasyonları hesaplandı ve sonuçlar mikromol/mg protein olarak verildi.



Şekil-10. NO standart eğrisi.

Hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Nitrat + Nitrit } (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y\text{-kesişim}}{\text{Eğim}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{L}}{40 \mu\text{L}} \right) \times \text{dilüsyon faktörü}$$

Kit katoloğunda, yöntemin minimum saptama limiti: 2,5µM, inter-assay (farklı günlerde) CV değeri %3,4 (n=5), intra-assay (aynı gün içinde) CV değeri %2,7 (n=84) olarak verilmiştir.

7. Beyin Dokusunda Protein Düzeyi Ölçümü

Beyin dokusu örneklerinden 50mM soğuk potasyum fosfat tamponunda (1:9, a/v) hazırlanan homojenatın santrifüj edilmesi ile elde edilen supernatanlardaki protein düzeyi, proteinlerin benzethonium klorid ile denaturasyonu sonrası oluşan bulanıklığın 404 nm dalga boyunda belirlenmesi esasına dayanan yöntem ile ölçüldü.¹³³

3. 3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS analiz programı (SPSS for Windows, version 13,0, SPSS Inc, Chicago) kullanılarak yapıldı. Elde edilen tüm sayısal veriler, normal dağılım özelliği yönünden Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler için tanımlayıcı istatistikler ortalama ± standart sapma; normal dağılmayan veriler için ortanca

(en küçük değer ve en büyük değer) olarak ifade edildi. Normal dağılım gösteren verilerin çoklu grup ortalamalarının karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ikili grup karşılaştırmaları için post hoc Sheffe testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin çoklu grup karşılaştırmalarında nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi; ikili grup karşılaştırmaları için Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Histopatolojik bulguların istatistiksel analizinde, histopatolojik değerlendirmedeki skor değerleri gruplandırılıp (düşük: skor 0 + skor 1, yüksek: skor 2 + skor 3) oluşturulan dört gzly çapraz tablolar kullanılarak Bonferroni düzeltmeli ki-kare (Chi-Square) testi uygulandı. Bu test sonucunda elde edilen p değeri 0,01'den küçük olduğunda; diğer istatistiksel değerlendirmelerde elde edilen p değeri 0,05'ten küçük olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Fizyolojik Ölçümler

Ratların travma öncesi (0. saat) ve travma sonrası (24. saat) ağırlık, rektal ısı, solunum sayısı ve kalp atım hızı gibi fizyolojik parametreleri kaydedildi ve grupların ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo–2 ve Tablo–3). Deneysel olarak oluşturulan travmanın ve sonrasında verilen simvastatin tedavisinin fizyolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

Tablo–2: Deneklerin travma öncesi (0. Saat) ölçülen fizyolojik parametrelerinin gruplar arası dağılımı.*

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)
Ağırlık (g)	304,7 ± 10,0	308,3 ± 7,1	307,1 ± 11,2	306,8 ± 8,7
Rektal Isı (°C)	36,2 ± 0,2	36,2 ± 0,2	36,3 ± 0,2	36,3 ± 0,2
Solunum Sayısı	134,1 ± 0,9	133,8 ± 0,7	133,8 ± 1,7	132,8 ± 1,6
Kalp Atım Hızı	239,3 ± 5,4	235,5 ± 6,4	233,0 ± 2,7	234,5 ± 5,8

*Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

S: sham, T travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

Tablo–3: Deneklerin travma sonrası (24. Saat) ölçülen fizyolojik parametrelerinin gruplar arası dağılımı.*

	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)
Ağırlık (g)	308,3 ± 7,0	299,5 ± 6,7	303,3 ± 6,4
Rektal Isı (°C)	36,4 ± 0,3	36,2 ± 0,1	36,4 ± 0,4
Solunum Sayısı	134,1 ± 0,9	133,5 ± 1,2	133,9 ± 1,1
Kalp Atım Hızı	237,8 ± 6,9	240,1 ± 5,4	235,6 ± 5,6

* Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

T travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

4. 2. Histopatolojik Bulgular

Tüm çalışma gruplarına ait beyin doku örneklerinin hipokampal ve pons-serebellum bölgelerinden hazırlanan aksiyel kesitlerin ışık mikroskopunda histopatolojik incelemesinde

kanama, ödem, nöronal hasar (pembe iskemik nöronlar-perinöral vakuolizasyon), retraksiyon ball-diffüz aksonal hasar, vasküler konjesyon varlığı ve yaygınlığı değişken olarak alındı. Skorlama 3 puan üzerinden yapıldı; 0: İzlenmedi, 1: Hafif derecede izlendi, 2: Orta derecede izlendi, 3: Yoğun izlendi şeklinde değerlendirildi (Tablo-4). İstatistiksel analiz için skorlar; düşük: skor 0 + skor 1, yüksek: skor 2 + skor 3 şeklinde gruplandırıldı.

Tablo-4. Beyin dokularına ait histopatolojik bulguların gruplara göre dağılımı.

Skor	n	Nöronal hasar				Retraksiyon ball- DAH				Vasküler konjesyon				Ödem				Kanama			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Sham	6	6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	5	1	-	-
Travma	6	-	1	5	-	-	1	5	-	-	4	2	-	-	3	2	1	-	-	3	3
Travma+çözücü	7	-	1	6	-	-	1	6	-	-	6	1	-	-	6	1	-	-	1	3	3
Travma+simvastatin	7	2	5	-	-	1	6	-	-	-	7	-	-	7	-	-	-	6	1	-	-

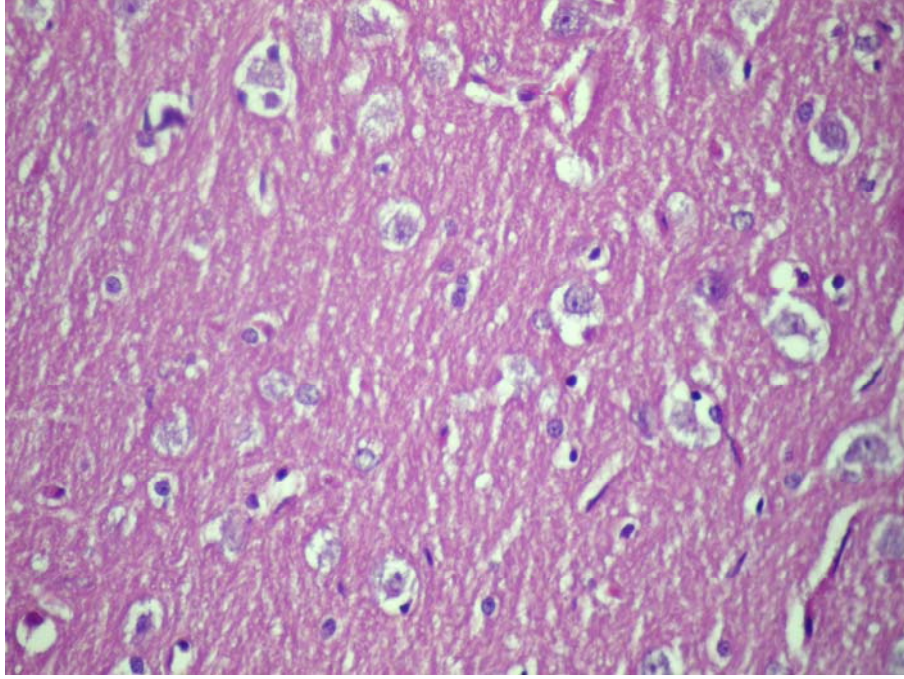
Tablo-5. Beyin dokularının histopatolojik incelemesinden elde edilen yüksek skorların (\geq skor2) gruplara göre dağılımı.

	n	Nöronal hasar		Retraksiyon ball- DAH		Vasküler konjesyon		Ödem		Kanama	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Sham	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Travma	6	5	83,3 ^a	5	83,3 ^a	2	33,3	3	50,0 ^a	6	100 ^a
Travma+çözücü	7	6	85,7	6	85,7	1	14,3	1	14,3	6	85,7
Travma+simvastatin	7	0	0 ^b	0	0 ^b	0	0	0	0 ^b	0	0 ^b

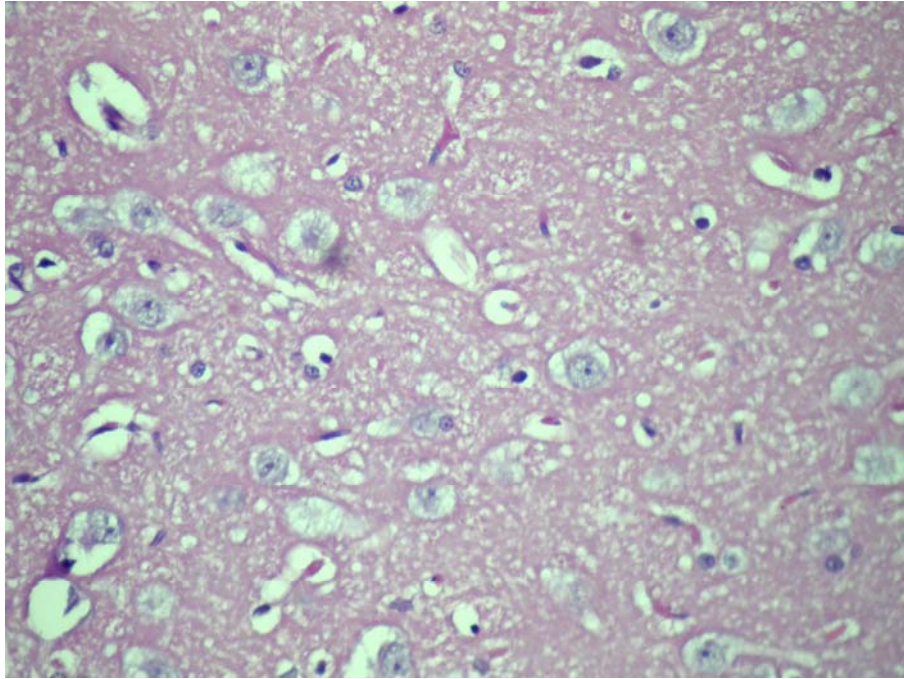
a, $p < 0.05$ (sham ile karşılaştırıldığında)

b, $p < 0.05$ (travma ile karşılaştırıldığında)

Nöronal hasar değerlendirildiğinde; sham grubuna (Skor \geq 2: % 0) ait örneklerde sinir ve glia hücrelerinde normal histolojik yapılar izlendi (Resim-5). Özellikle sinir hücrelerinde hücre sınırları, çekirdek ve çekirdekcik belirgin; sitoplazmada serbest ribozom ve granüler endoplazmik retikulum sisternalarının oluşturduğu Nissl cisimciklerinin normal özelliklerini korumuş olduğu gözlemlendi. Travma grubunda (skor \geq 2: %83,3) sham grubuyla karşılaştırıldığında artmış olan nöronal hasarın ($p=0,001$), simvastatin verilen grupta (skor \geq 2: % 0) belirgin derecede azaldığı ($p=0,001$) görüldü (Resim-6). Travma ve Travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



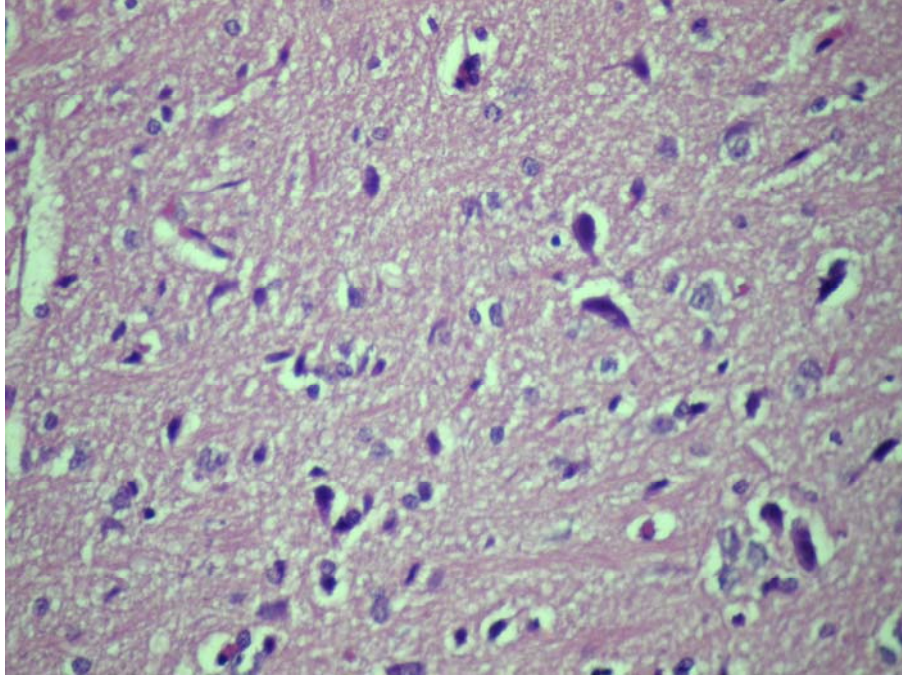
Resim-5: Sham-grubu: Normal nöronal dağılım (H&Ex400).



Resim-6: Travma+simvastatin grubu: Nöronlarda normal histopatolojik bulgular, seyrek retraksiyon ball oluşumu (H&E400).

Retraksiyon ball-DAH değerlendirildiğinde; sham (skor \geq 2: %0) ve travma + simvastatin grubunda (skor \geq 2: %0) retraksiyon ball oluşumu az görülürken, travma (skor \geq 2: % 83,3, $p=0,001$) ve travma+çözücü grubunda (skor \geq 2: %85,7) özellikle sham grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede retraksiyon ball oluşumu gözlemlendi ($p=0,005$) (Resim-7).

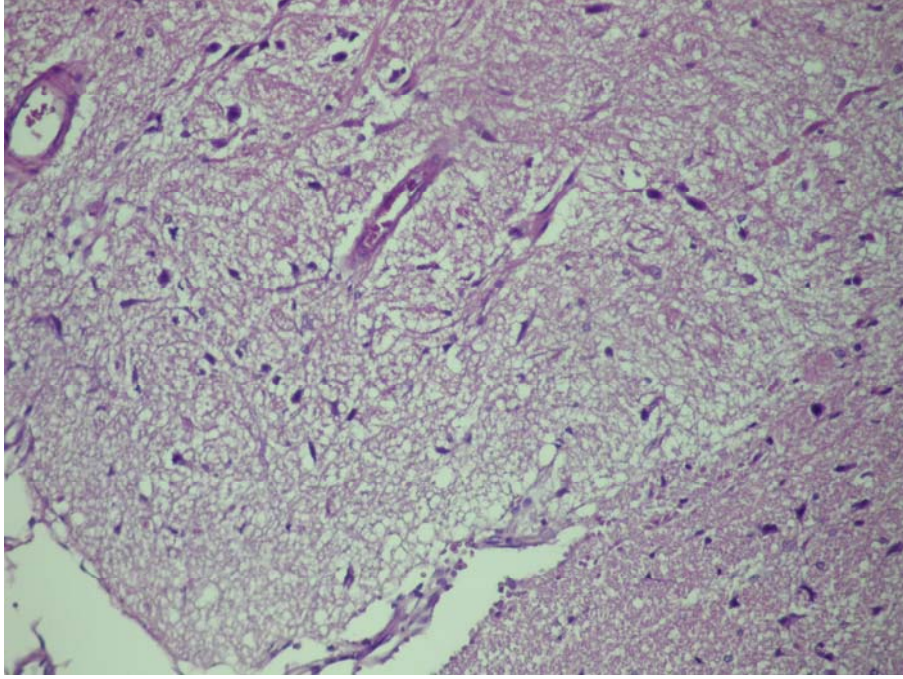
Simvastatin verilen grupta (skor ≥ 2 :%0), retraksiyon ball oluşumu belirgin şekilde azaldı (p=0,001). Travma ve travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



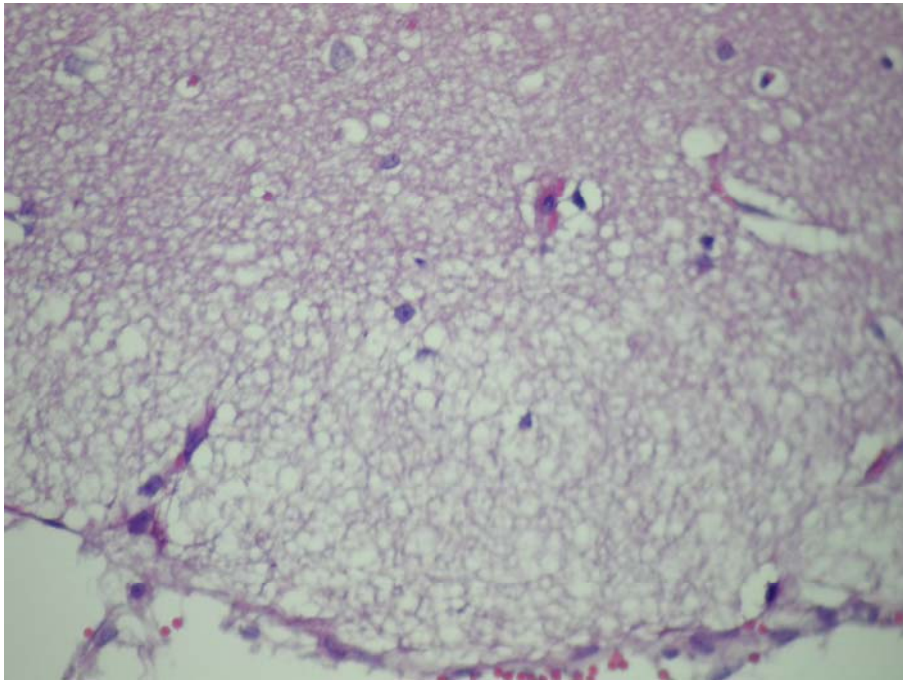
Resim-7: Travma grubu: Ağır nöronal hasar, retraksiyon (DAH), Skor 3 (H&Ex400)

Vasküler konjesyon oluşumu değerlendirildiğinde; travma grubunda (skor ≥ 2 : 33,3) sham grubuyla (skor ≥ 2 : %0) karşılaştırıldığında vasküler konjesyon artmış, simvastatin verilen grupta (skor ≥ 2 : %0) travma grubu ile karşılaştırıldığında azalmış bulundu, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05). Travma ve travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Ödem oluşumu değerlendirildiğinde, ödem oluşumunun sham grubuyla (skor ≥ 2 : %1) karşılaştırıldığında travma grubunda (skor ≥ 2 : %50), belirgin olarak arttığı (p=0,006) (Resim-8), simvastatin verilen grupta (skor ≥ 2 :%0), travma grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (p=0,004)(Resim-9). Travma ve travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

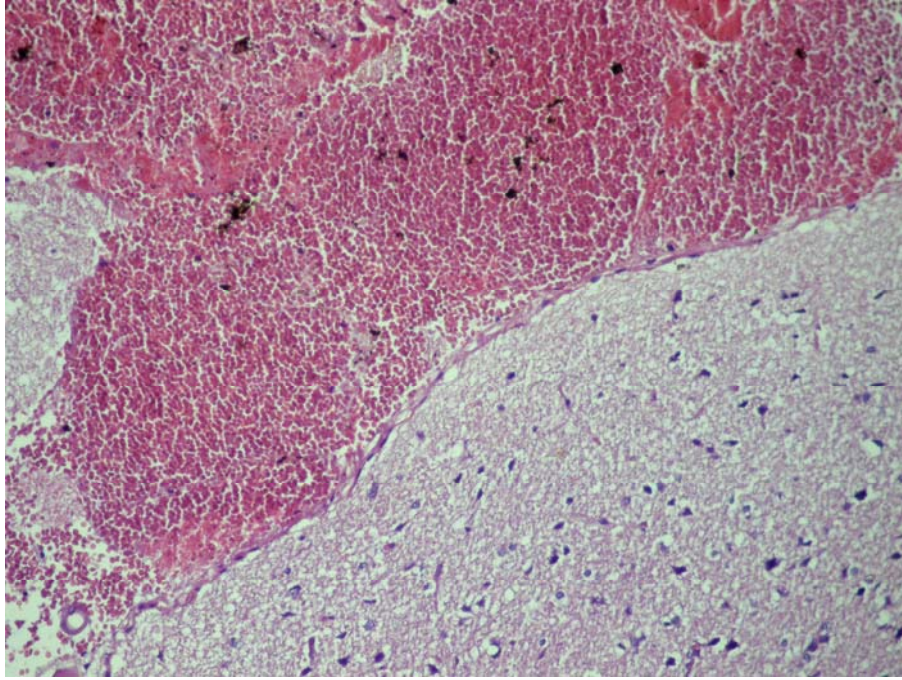


Resim-8: Travma grubu: Yoğun ödem-Skor 3 (H&Ex200).



Resim-9: Travma+simvastatin grubu: Ödem-Skor 2 (H&Ex200).

Kanama varlığı değerlendirildiğinde; travma grubunda (skor ≥ 2 : %100) sham grubuyla (skor ≥ 2 : %0) karşılaştırıldığında daha fazla intraserebral kanama izlenirken ($p < 0,001$)(Resim-10), travma+simvastatin (skor ≥ 2 : %0) grubunda travma grubu ile karşılaştırıldığında intraserebral kanamanın belirgin derecede azaldığı görüldü ($p = 0,001$). Travma ve travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Resim-10. Travma grubu: Yoğun intraserebral kanama – Skor 3 (H&Ex200).

4. 3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4. 3. 1. TK, LDL-K ve HDL-K Düzeyleri

Tüm deneklerden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda ölçülen TK, LDL-K ve HDL-K düzeyleri açısından simvastatin tedavisi verilen grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (Tablo-6).

Tablo-6. Deneklerin serum TK, LDL-K ve HDL-K düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.*

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)	p**
TK (mg/dL)	39,5 \pm 9,2	47,2 \pm 11,5	51,5 \pm 8,8	44,7 \pm 7,9	0,12
LDL-K (mg/dL)	5,1 \pm 1,2	6,0 \pm 1,0	6,2 \pm 1,8	5,0 \pm 0,8	0,21
HDL-K (mg/dL)	13,8 \pm 2,9	15,3 \pm 4,7	15,1 \pm 2,9	12,1 \pm 2,6	0,29

* Değerler ort \pm SD olarak verilmiştir.

** one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

S: sham, T: travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

4. 3. 2. MDA Düzeyleri

Tablo-7’de görüldüğü gibi, serum ve beyin dokusunda ölçülen MDA düzeyleri, travma grubunda sham grubuna göre belirgin bir artış göstermiş ($p<0,001$); simvastatin tedavisi verilmesi ile anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,05$) (Grafik-1, Grafik-2). Travma ve travma + çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo-7. Beyin dokusu ve serumda ölçülen MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.*

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)
MDA doku (nmol/mg protein)	0,072±0,05	0,69 ^{a,b} ±0,18	0,46 ^c ±0,24	0,08 ^d ±0,08
MDA serum (nmol/mL)	41,4±1,7	43,9 ^{e,f} ±1,9	42,9±0,8	41,3±0,4

S: sham, T: travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

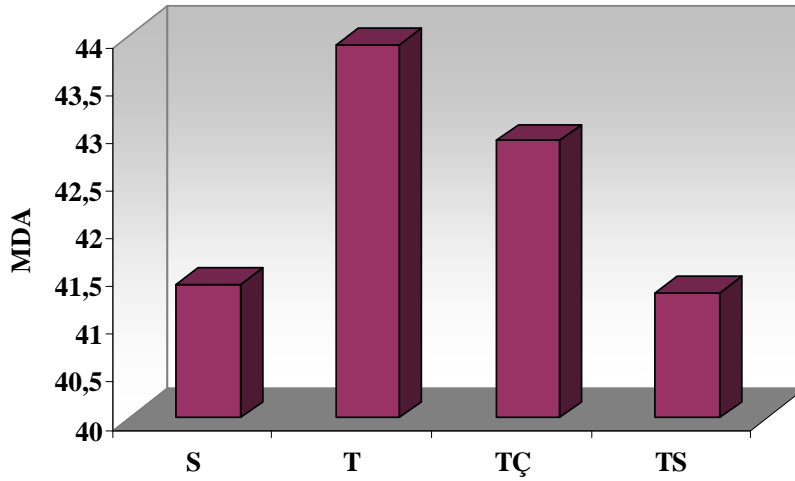
*Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

p değeri one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

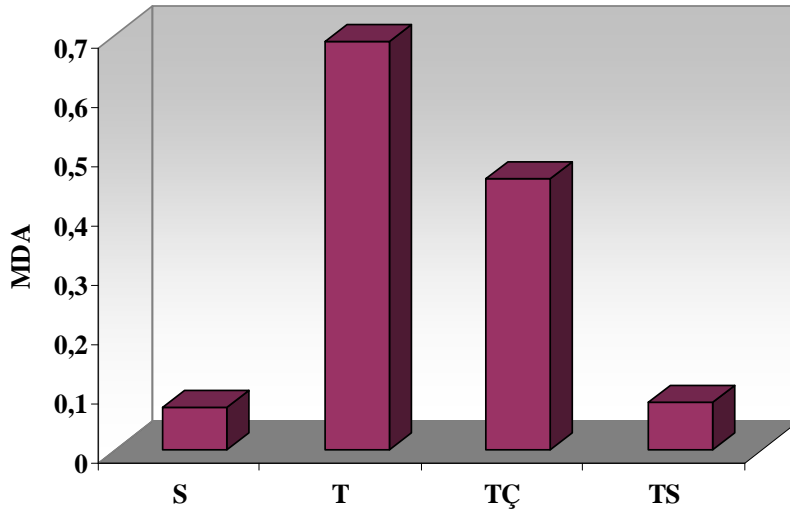
a, $p<0,001$ (S ile karşılaştırıldığında); b, $p<0,001$ (TS ile karşılaştırıldığında);

c, $p: 0,002$ (S ile karşılaştırıldığında); d, $p<0,05$ (TS ile karşılaştırıldığında);

e, $p<0,05$ (S ile karşılaştırıldığında); f, $p<0,05$ (TS ile karşılaştırıldığında).



Grafik-1. Serumda ölçülen MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı.



Grafik-2. Beyin dokusunda ölçülen MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

4. 3. 3. SOD Aktivitesi

Beyin dokusu SOD enzim aktivitesi travma grubunda sham grubuna göre azalmış; simvastatin verilen grupta ise travma grubuna göre artmış olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo-8, Grafik-3).

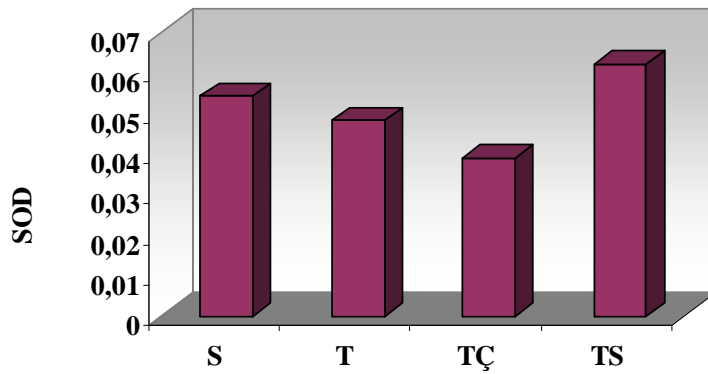
Tablo-8. Beyin dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması.*

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)	p**
SOD (U/mg protein)	0,054±0,02	0,015±0,015	0,039±0,013	0,062±0,013	> 0.05

*Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

** one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

S: sham, T: travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.



Grafik-3. Beyin dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı.

4. 3. 4. TAK Düzeyleri

Tablo-9 ve Grafik-4'te görüldüğü gibi deneklerin beyin dokusu ve serumunda ölçülen TAK düzeyleri travma grubunda sham grubuna göre azalmış, simvastatin verilen grupta ise travma grubuna göre artmış olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($p>0,05$).

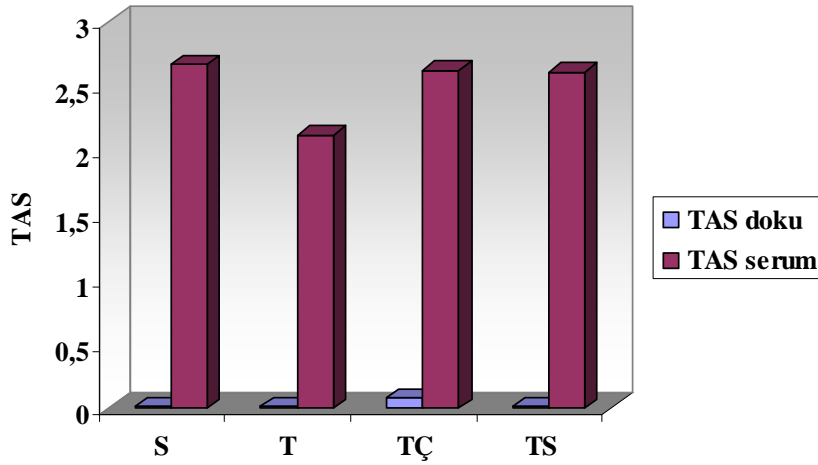
Tablo-9. Beyin dokusu ve serumda ölçülen TAS düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.*

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)	p**
TAS doku (mmolTroloxEquiv./mg protein)	0,015±0,006	0,015±0,006	0,078±0,003	0,012±0,004	> 0,05
TAS serum (mmolTroloxEquiv./L)	2,67±0,19	2,12±0,73	2,61±0,49	2,61±0,31	> 0,05

*Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

** one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

S: sham kontrol, T: travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.



Grafik-4. Beyin dokusu ve serumda ölçülen TAS düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

4. 3. 5. VEGF Düzeyleri

Tablo-10 ve Grafik-5'te görüldüğü gibi deneklerin beyin dokusu ve serumunda ölçülen VEGF düzeyleri travma grubunda sham grubuna göre belirgin bir artış göstermiş ($p = 0.002$); simvastatin verilmesi ile önemli derecede azalmıştır ($p = 0.001$). Travma ve travma + çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

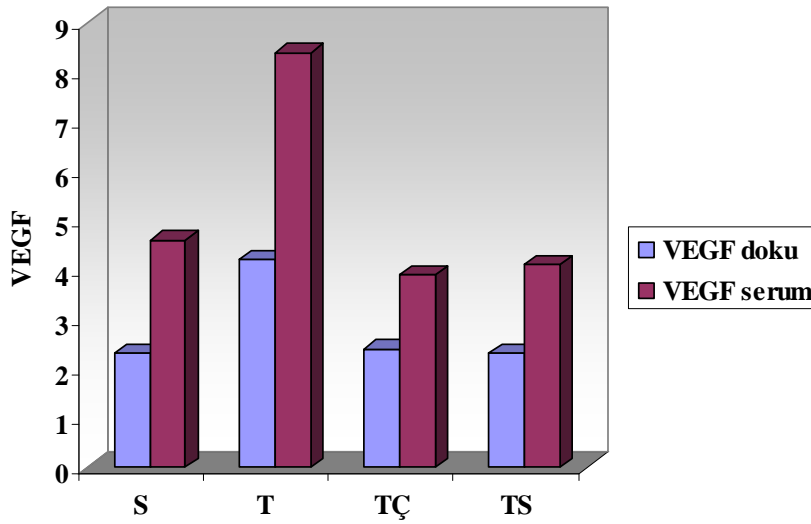
Tablo-10: Beyin dokusu ve serumda ölçülen VEGF düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.

	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)
VEGF doku (pg/mg protein)*	2,3±0,19 (1,7-2,8)	4,2 ^{a,b} ±1,32 (3,6-12,0)	2,4±0,83 (1,8-8,1)	2,3±0,12 (1,7-2,5)
VEGF serum (pg/mL)**	4,61±1,7	8,42 ^{c,d} ±3,0	3,86 ± 2,6	4,10±1,3

S: sham kontrol, T travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

* Değerler ortanca ± S.E.Mean (min-max) olarak verilmiştir. **Değerler ort ± SD olarak verilmiştir. p değeri * Kruskal Wallis testi, **one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

a, $p:0,001$ (S ile karşılaştırıldığında); b, $p:0,001$ (TS ile karşılaştırıldığında),
c, $p: 0,04$ (S ile karşılaştırıldığında); d, $p:0,02$ (TS ile karşılaştırıldığında).



Grafik-5. Beyin dokusu ve serumda ölçülen VEGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

4. 3. 6. Nitrik Oksit Düzeyleri

Tablo-11 ve Grafik-6'da görüldüğü gibi deneklerin beyin dokusunda ölçülen NO düzeyleri travma grubunda sham grubuna göre belirgin bir artış göstermiş ($p<0,05$) simvastatin verilmesi ile önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). Travma ve travma+çözücü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo-11. Beyin dokusunda ölçülen NO düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması *

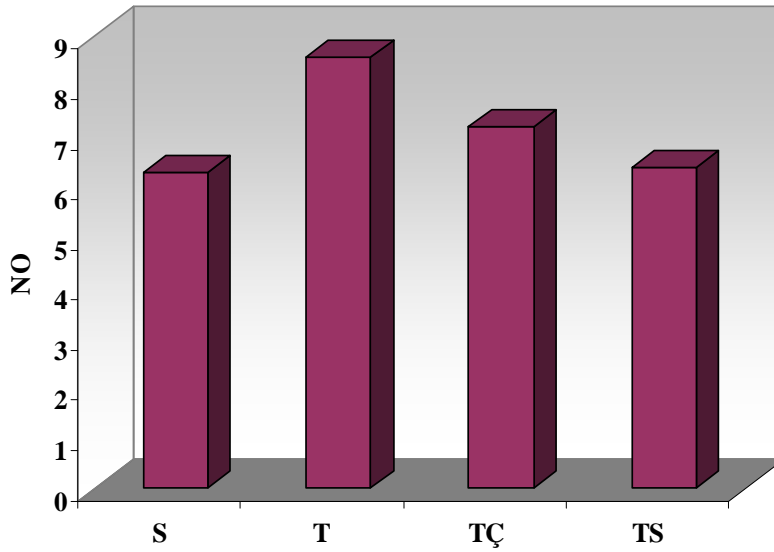
	S (n=6)	T (n=6)	TÇ (n=7)	TS (n=7)
NO (mikromol/mg protein)	6,3±1,2	8,6 ^{a, b} ±1,5	7,2±1,0	6,4±1,6

S: sham kontrol, T travma, TÇ: Travma + çözücü, TS: Travma + simvastatin.

*Değerler ort ± SD olarak verilmiştir.

p değeri ** one way ANOVA testi ile hesaplanmıştır.

a, $p<0,05$ (S ile karşılaştırıldığında); b, $p<0,05$ (TS ile karşılaştırıldığında).



Grafik-6. Beyin dokusunda ölçülen NO düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

5. TARTIŞMA

Günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biri haline gelmiş olan kafa travmalarına bağlı olarak oluşan TBH, öldürücü, sakat bırakıcı, uzun süre tedavi ve bakım gerektiren patolojik bir durumdur. Travma nedeniyle oluşan primer beyin hasarını takiben ilerleyen dakikalar, hatta günler içinde ortaya çıkan sekonder beyin hasarının fizyopatolojik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, son yıllarda bazı hücrel ve biyokimyasal faktörler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Sekonder hasara neden olan başlıca mekanizmalar arasında kalsiyuma bağımlı hücre hasarı, nörotransmitter salınımı, serbest radikal oluşumu, gen aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır.¹ TBH'da prognozu önemli ölçüde olumsuz etkilediği gösterilen sekonder beyin hasarına neden olan faktörlerin bir kısmı tedaviyle ortadan kaldırılarak mortalite ve morbiditenin azaltılması sağlanabilir.¹³⁴

TBH'da, sekonder biyokimyasal hasarı ve hücre ölümünü sınırlayabilmek için çeşitli farmakolojik ajanların etkileri birçok hayvan modelinde çalışılmıştır. Ancak hayvan modelinde ümit verici nöroprotektif tedavi protokolleri insanlarda uygulandığında yeterince başarı elde edilememiştir. Bazı kavramsal ve metodolojik nedenler hayvan deneylerinin kliniğe aktarılmasında zorlukları artırmaktadır.¹⁰⁸ Bu nedenler arasında, oluşturulan hasarın insanda oluşan hasar ile benzerliğinin az olması, yetersiz ilaç dağılımı ve hayvan çalışmalarında sürelerin çok kısa olması ya da uygun olmaması sayılabilir. Ayrıca bu çalışmaların yalnız bir mekanizmayı hedef alıyor olması en önemli neden olarak görülmektedir.⁸⁴

Bu çalışmada deneysel kafa travması oluşturulan ratlara, travmanın oluşturacağı hasara karşı olası koruyucu etkilerini araştırmak amacı ile akut dönemde statin türevi bir ilaç olan simvastatin tedavisi verildi.

İnsanlarda sık görülen, en çok motorlu taşıt kazalarına bağlı olarak meydana gelen diffüz kafa travması ile benzerliği nedeniyle, bu çalışmada Marmarou ve ark.'nın tanımladığı kafatasının sağlam kaldığı kapalı kafa travması modeli uygulandı.¹²⁶

Kafa travmasına bağı DAH, beyin ve beyin sapı boyunca aksonlarda morfolojik ve fonksiyonel hasarla karakterizedir ve beyaz cevherde diffüz dejenerasyona yol açar.¹⁴ Travmayı takiben gelişen primer beyin hasarında DAH'ın karakteristik özellikleri olarak, şişen aksoplazmaya ait amorf-belirgin bir şekle sahip olmayan ve retraksiyon topları olarak adlandırılan, beyaz cevher içerisine dağılmış aksonal parçalanmalar görülür.¹⁶ Bu çalışmada, rat beyin dokularının histopatolojik incelemesinde, tedavi uygulanmayan travma grubundaki ratlarda, daha önce tanımlanan DAH bulguları ile uyumlu olarak nöronal hasar (Resim-7), perinöral vakuolizasyon, retraksiyon ball oluşumu ve DAH (Resim-7), vasküler konjesyon, ödem oluşumu (Resim-8) ve intraserebral kanama (Resim-10) gözlemlendi.

HMG-KoA redüktaz inhibitörleri olan statinler koroner arter hastalıkları ve serebral vasküler hastalıklarda morbidite ve mortaliteyi azaltan kan lipid düzeylerini düşürücü ilaçlar olarak geliştirilmiştir.¹³⁵ Lipid düzeylerini düşürücü etkilerine ek olarak statinlerin vasküler inflamasyonun baskılanması trombosit agregasyonunun ve trombozun engellenmesi ve endotelde NO üretiminin artırılması gibi çok sayıda yararlı etkisi de gösterilmiştir.^{110,136,137} Çok yönlü etkilere sahip olan statinlerin, TBH'dan sonra sekonder vasküler hasarı, trombozu ve lezyon hacmini azalttıkları ileri sürülmektedir.¹³⁸ Ayrıca statinlerin inme atağından sonra nörojenezi, sinaptogenezi ve anjiogenezi artırdıkları, önemli derecede nörolojik iyileşme sağladıkları bildirilmiştir.¹¹⁷ Bu nedenle kafa travmasından sonra gelişen sekonder hasarda statinlerin koruyucu olup olmadıklarının ve olası koruyucu etkilerinin hangi mekanizma ile ortaya çıktığının araştırılması, gelişen beyin hasarının akut döneminde tedaviyi hedefleyen yeni bir klinik yaklaşım getirilebilir.

Çalışmamızda ratlarda deneysel olarak oluşturulan kapalı diffüz kafa taraması modelinde statinlerin akut dönemdeki etkilerini araştırmak amacıyla travmadan 3 saat sonra 1mg/kg dozunda i.p. olarak simvastatin tedavisi verilmiştir. Doku dağılımı ve metabolizması farklılık gösteren çok sayıda statin türevi arasında simvastatin daha fazla lipofilik özelliğe sahip ve KBB'ni en iyi geçebilen statin olduğu için seçilmiştir.¹²³ Daha önce yapılan in vivo çalışmalarda statinler mikromolar konsantrasyonlarda kullanılmış ve düşük konsantrasyonlardaki (0,01-0,1 µmol/L) atorvastatinin endotel hücrelerinde ajiogenezi uyardığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise (> 0,1 µmol/L) antianjiogenik etki gösterdiği saptanmıştır. Statinlerin anjiogenez üzerine farklı etkilerinin kısmen doza bağı olabileceği ileri sürülmüştür.¹³⁹ Ratlarda deneysel olarak oluşturulan travma modellerinde yapılan çalışmalarda düşük doz (1mg/kg) ve yüksek doz (37,5 mg/kg) simvastatin tedavisi verilmiş; bu çalışmaların çoğunda travmadan sonra 14-35 gün boyunca tedaviye devam edilmiştir.^{140,141}

Yapılan in vitro çalışmalarda ise simvastatinin etkilerinin doza bağımlı olabileceği ileri sürülmüş; değişik sürelerde verilen, farklı dozlardaki simvastatin tedavisinin etkileri incelenmiş ve değişik sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada travmadan sonra akut dönemde tek ve düşük doz simvastatinin etkilerini araştırmak amacıyla ratlarda deneysel olarak oluşturulan travmadan 3 saat sonra 1mg/kg dozda simvastatin tedavisi verilmiştir.

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan travmanın ve sonrasında akut dönemde verilen simvastatin tedavisinin deneklerin fizyolojik parametrelerinde (Tablo-2, Tablo-3) ve serum kolesterol (TK, LDL-K, HDL-K) düzeylerinde (Tablo 6) istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi.

Kafa travmasından sonra ortaya çıkan TBH'da gelişen sekonder hasarın önemli bir bileşeni olan oksidatif hasar sırasında, geçiş elementlerinin veya redoks potansiyeline sahip elementlerin varlığında özellikle hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu olarak bilinen bir reaksiyonla daha potent bir ROT olan OH[•] üretilmektedir. Bu radikalın yarı ömrü çok kısa olmakla birlikte bulunduğu ortamdaki kimyasal bileşiklerle veya yapılarla kolayca reaksiyona girerek hasar oluşturabilecek kapasitededir.¹⁴³ Hidroksil radikalleri özellikle membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek LP'ye neden olmakta, membranın üç boyutlu yapısını değiştirmekte, membran içinde lokalize olan ve taşıyıcı, reseptör veya yapısal fonksiyon gören proteinlerin fonksiyonlarını etkilemekte, membranın geçirgenliğini değiştirmekte ve seçici geçirgen özelliğini yok etmektedir.¹⁴⁴ SSS'de travma sonrası ROT ve LP oluşumunun fizyopatolojik önemi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hall ve ark. tarafından 1993 yılında yapılan bir çalışmada ratlarda deneysel akut kafa travması oluşturulmuş ve OH[•] radikali düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.¹⁴⁵ OH[•] radikallerinin travmadan hemen sonra artmaya başladığı ve 1 saat sonra en üst düzeye ulaştığı gösterilmiştir. Sonuç olarak OH[•] radikallerinin vasküler endotelde hasar oluşturduğu ve KBB'yi bozarak beyin membranlarında LP'yi başlattığı bildirilmiştir. Smith ve ark. ratlarda oluşturdukları deneysel akut kafa travmasından 5 dk. sonra KBB hasarının belirgin olduğunu ve buna paralel olarak LP oluşmasında anahtar rol oynayan OH[•] radikali düzeylerinin arttığını göstermişlerdir.¹⁴⁶

Yapılan çalışmalarda, lipid peroksidasyonunun yıkım ürünü ve önemli bir göstergesi olan doku MDA düzeylerinin deneysel kapalı kafa travmasından sonra akut dönemde arttığı gösterilmiştir.^{147,148} Willmore ve Rubin tarafından yapılan bir çalışmada ratlarda MDA'nın doku düzeyleri ile fokal ödem arasında bir paralellik olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁹ Çalışmamızda da daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde TBH'da ortaya çıkan oksidatif stresin kanıtı

olarak ratların serumunda ve beyin dokusunda ölçülen MDA düzeylerinin travma grubunda arttığı ($p < 0,05$) gözlemlendi.

Travma sonucu beyinde antioksidan mekanizmalar arası dengelerin bozulması ile açığa çıkan ROT'un oluşturduğu LP, sekonder beyin hasarının önemli nedenlerinden birisidir. Travmatik iskemi sonrası oluşan nöronal hasarı önlemek ve nörolojik olumsuz sonuçları düzeltmek için ROT üretimini veya dağılımını azaltmak gerekmektedir. SSS'de travma veya iskemi sonrası, ROT önleyicilerin tedavi edici etkileri ile klinik ve histopatolojik iyileşme sağlandığı bilinmektedir.

Deneyisel akut kafa travmasından sonra, OH[•] radikallerinin KBB hasarına neden olduğunun gösterildiği çalışmada, travmadan sonra verilen lipid peroksidasyon inhibitörü olan trilazad mesylate'ın OH[•] radikalleri konsantrasyonunu ve KBB'nin geçirgenliğini azaltarak membran lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.¹⁴⁶ Beyinde bu tür hasarların önüne geçmek için birçok ajan denenmiştir. Bunların en önemlilerinden biri E vitamini'dir.¹⁵⁰ E vitamini, yapısında bulundurduğu hidroksil grubu nedeniyle elektron alıp verme özelliği kazandığından dolayı antioksidan karakterli bir vitamin olarak bilinmektedir. Ayrıca yapısında bulunan uzun hidrokarbon zinciri ve halkasal yapılar nedeni ile daha çok lipidlere benzediğinden bütün lipid yapılarını, yani membranları kolayca geçebilmekte veya membranların yapısı içine lokalize olabilmektedir. Oksidatif strese oldukça yatkın olan lipid yapılarını, membranlarda oksidatif stres sonucu olarak gelişebilecek LP'na karşı korumaktadır.¹⁴³

Çalışmamızda travmadan 3 saat sonra verilen tek doz simvastatin tedavisi ile travma grubundaki ratların beyin dokusu ve serumunda MDA düzeylerinin azaldığı ($p < 0,05$) gözlemlendi. Literatür taramasında TBH'da statinlerin MDA düzeyleri üzerine etkilerinin daha önce araştırılmadığı saptandı. Bu nedenle çalışmamızda ilk kez simvastatinin travmatik beyin hasarında artan oksidatif stresin hücresel düzeyde bir belirteci olan lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiş oldu.

Ratların serum ve beyin dokusunda ölçülen TAK düzeyi ve beyin dokusunda ölçülen antioksidan enzim SOD aktivitesinin travma grubunda sham grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı, simvastatin verilen grupta ise arttığı gözlemlendi. Ancak TAK düzeyleri ve SOD aktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Daha önce yapılan bir çalışmada ratlarda oluşturulan deneysel akut kapalı beyin travmasından sonra beyin dokusunda SOD aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.¹⁵¹ Deneysel kafa travması modellerinde beyin dokusunda TAK ölçümünün yapıldığı çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da,

travmadan sonra ortaya çıkan oksidatif stres sonucu artan ROT'un ortadan kaldırılması için kullanılan antioksidan mekanizmalar nedeniyle, travma grubunda TAK düzeyleri ve SOD aktivitesinin azaldığını söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da simvastatinin beyin dokusunda ve serumdaki TAK düzeyleri ve SOD aktivitesinde artış sağladığı da gözlemlendi. Travmatik beyin hasarında statinlerin çok sayıda yararlı etkilerini gösteren çalışmalar olmasına karşın beyin dokusunda antioksidan enzim aktiviteleri ve TAK üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Ancak daha önce yapılan deneysel çalışmalar, kardiyovasküler hastalıklarda statinlerin lipid profilini düzeltici etkilerinin dışında, direkt damar koruyucu etkileri olduğu; aorta endotelinde, düz kas hücrelerinde ve kardiyak miyositlerde NADPH oksidaz aktivitesine bağlı süperoksit anyon oluşumunu azalttığı bildirilmiştir.^{152,153} Statinlerin ROT oluşumunu önlemesinin mekanizması, NADPH oksidazın sitozolden membrana tranlokasyonunu ve Rac-GTPaz aktivasyonunu inhibe ederek NADPH oksidaz aktivitesini engellediği şeklinde açıklanmıştır.¹⁵⁴ Haendeler ve ark. ise endotel hücre kültüründe yaptıkları in vitro çalışmada, statinlerin, O_2^- ve H_2O_2 moleküllerini bağlayan ve metabolize edebilen tioredoksinin S-nitrozilasyonunu artırıp posttranskripsiyonel aktivitesini düzenleyerek hücre içi ROT düzeylerini düşürdüğünü ileri sürmüşlerdir.¹⁵⁵ Sonuçta SSS dışındaki dokularda, özellikle endotel hücrelerinde yapılan in vitro çalışmaların sonuçlarına göre statinlerin antioksidan etkinliği de olduğu söylenebilir.

Kafa travmasından kısa süre sonra oluşmaya başlayan ve hızla ilerleyen beyin ödemi, birçok patolojik sürecin başlamasına neden olmaktadır. Bunlardan en önemlilerinden biri de hiç kuşkusuz damarsal yapıların baskı ile daralarak hipooksijenasyona ve sonuçta anoksiye neden olmasıdır. Beyin travmaya maruz kaldığında, serebral otonöregülasyon bozulmakta ve küçük serebral arterler genişlemekte, kapiller hidrostatik basınç artışıyla kan plazması intersellüler alana geçerek beyinde dolaşım bozukluğu meydana gelmektedir. Dolayısıyla travma sonrasında ardı sıra meydana gelen olaylar kısmen iskemi tablosuna benzemektedir.¹⁵⁶

Kafa travmasından sonra serebral kan akımının azalması ile oluşan hipoksik/iskemik durum, ilerleyen nöron hasarına ve KBB'nin bozulmasına katkıda bulunan önemli bir faktördür.¹⁵⁷ Hipoksik durumlarda KBB'nin bozulması multifaktöriyeldir ve nedenleri arasında beyin dokusunda VEGF, NO ve inflamatuvar sitokinlerin artışı yer alır. VEGF, hipoksik durumlarda SSS'de astrositler tarafından eksprese edilen anjiyogenik bir büyüme faktörüdür ve reseptörleri olan VEGFR1 ve VEGFR2'ye bağlanarak fizyolojik ve patolojik durumlarda anjiyogenezisi düzenler.¹⁰⁴ Hipoksi, VEGF geninin transkripsiyonunun düzenleyicisi olan hipoksiyle indüklenen faktör-1 α 'yı (HIF-1 α) uyarır. HIF-1 α , VEGF

geninin 5'-ucuna komşu bölgesinde yer alan hipoksiye yanıt elementine bağlanır ve genin transkripsiyonunu artırır.¹⁵⁸ HIF-1 α ayrıca iNOS'un transkripsiyonel aktivatörüdür ve NO oluşumunu artırır.¹⁰⁶ Ayrıca vasküler permeabilityi arttıran faktör olarak da bilinen VEGF serebral ödeme yol açar. Çünkü VEGF'e yanıt olarak oluşan damarlar normalden fazla sızıntılıdır ve beyin ödemi artırarak iskemiye bağlı hasarı ilerletmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, inme atağından 48 saat sonra iskemik ratlara rekombinant human VEGF verilmesinin serebral mikrovasküler plazma perfüzyonunu artırdığı ve fonksiyonel nörolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir.¹⁰⁴ Ancak inme atağından 1 saat sonra verilen rhVEGF, KBB sızıntısını, hemorajik dönüşümleri artırmış ve iskemik hasarın ilerlemesine neden olmuştur. Bu bulgular iskemik beyin dokusunda VEGF artışının serebral mikroperfüzyonu ve KBB sızıntısını artırarak iki yönlü rol oynadığını göstermektedir. Bu bilgiler ışığında hasarlı beyin dokusunda VEGF'in travmadan sonra erken dönemde (1 saat sonra) artışının KBB sızıntısını artırarak ödeme neden olabileceği, geç dönemde ise (48 saat sonra) anjiogenezisi artırarak nörolojik iyileşme sağlayabileceği sonucu çıkmaktadır.

VEGF, NO sentezini ve salınımını uyararak vasküler permeabilityi artırır. Beyin hasarından sonra akut dönemde VEGF inhibisyonunun KBB permeabilitesini azalttığı gösterilmiştir.¹⁵⁹ Yapılan çalışmalarda, serebellumda hipoksiye yanıt olarak VEGF ve NO düzeylerinde artış olduğu, deneysel travmatik beyin hasarında VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.^{160, 161}

Çalışmamızda, daha önce yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile uyumlu olarak ratların beyin dokusu ve serumunda ölçülen VEGF ve NO düzeylerinin travmaya yanıt olarak arttığı saptandı ($p < 0,05$). VEGF düzeylerindeki artış, kafa travmasından sonra serebral kan akımının azalması sonucunda gelişen hipoksiye yanıt olarak uyarılan HIF-1 α tarafından transkripsiyonunun artırılması ile açıklanabilir. NO düzeylerindeki artış ise travmadan sonra ekspresyonu artan VEGF tarafından eNOS ekspresyonunun uyarılmasına ve hücre içi kalsiyum artışına yol açan glutamata bağlı eksitotoksitenin NOS aktivitesini artırmasına bağlanabilir.^{71,79}

Normal metabolizma sırasında L-arjininden, NOS tarafından sentezlenen NO molekülü, beyinde KBB'nin işlevlerinde görevli iyonların ve diğer moleküllerin transportunu düzenleyerek birçok biyolojik mekanizmada rol alır. Ancak, TBH'dan sonra özellikle kalsiyumdan bağımsız bir form olan iNOS'un sentezlediği NO zararlı etkilere sahiptir. NO, KBB'nin permeabilitesini artırarak sekonder beyin hasarına ve vazojenik ödeme katkıda bulunur. Vazodilatasyon ve kan akımının artmasına yol açmasının yanında, eNOS'un VEGF'in uyardığı vasküler hiperpermeabilitede önemli rol aldığı ileri sürülmüştür.¹⁶²

Terpolilli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada TBH'dan sonra, yeni bir NOS inhibitörü olan 4-amino-tetrahydro-L-biopterine verilmesinin iNOS oluşumunu inhibe ettiği beyin ödemi oluşumunda ve uzun dönem nörolojik disfonksiyonda belirgin azalma sağladığı gözlenmiştir.⁸³ Yapılan deneysel çalışmalarda NO sentez inhibisyonunun, melatonin, minosiklin ve simvastatinin hipoksinin indüklediği KBB hasarını azalttığı bildirilmiştir.¹⁰⁶

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, deneysel kafa travmasından sonra ratların beyin dokusu ve serumunda artan VEGF ve NO düzeylerinin verilen simvastatin tedavisi ile azaldığını göstermektedir ($p < 0,05$). Anjiogenik bir faktör olarak bilinen VEGF'in hasarlı beyin dokusundaki artışının geç dönemde yararlı olduğu ve anjiogenezisi artırarak nörolojik iyileşme sağlayabileceği gösterilmiştir.¹⁰⁴ Ancak beyin hasarının erken döneminde VEGF artışı, KBB sızıntısını artırarak ödeme neden olmaktadır. Deneysel kafa travması oluşturduğumuz çalışmamızda, travmadan sonra akut dönemde verdiğimiz tek doz simvastatin tedavisinin VEGF ve NO düzeylerini azaltarak, bu faktörlerin neden olabileceği vasküler hiperpermeabiliteye bağlı beyin ödemi gelişimini önleyebileceği düşünülebilir.

Ayrıca TBH'da, NO'nun süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek oldukça reaktif nitratlayıcı türler olan ONOO⁻'leri oluşturduğu ve ONOO⁻'lerin de ölümcül hücrel süreçler olan aminoasitlerin aromatik halkalarının nitratlanmasına, lipid peroksidasyonuna, ve DNA kırılmalarına neden olduğu bilinmektedir.^{37,38,39} Çalışmamızda TBH'da verilen statin tedavisinin NO düzeylerini düşürerek beyin dokusunu oksidatif stresten koruduğu da söylenebilir.

Statinler, kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız çok sayıda özellikleri ile son yıllarda ilgi odağı olmuştur. Hayvan ve insanlarda yapılan in vivo çalışmalarda statinlerin böbrek ve kalp gibi çeşitli organlarda damar koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir.^{163,164} Statinlerin anjiogenetik etkileri ilacın dozuna, deneyde kullanılan endotel hücre tipine ve ortama bağlı olarak değişmektedir. Domuzlarda yapılan deneysel bir çalışmada, aynı doz simvastatin iskemik böbrekte anjiogenezi arttırırken, erken koroner aterosklerozda patolojik anjiogenezi azaltmıştır.^{163,164} Zhu ve ark. tarafından yapılan çalışmada aynı doz simvastatinin spesifik anjiogenik tetikleyicinin etkilediği intrinsik mekanizmaları değiştirerek anjiogenezi artırdığı veya inhibe ettiği gözlenmiş; statinlerin anjiogenik etkilerinin, anjiogenik uyarana, mekanizmalara ve çevre koşullarına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, farklı patolojik koşullarda simvastatin ile tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Zhu ve ark. bu çalışmada simvastatinin hipoksik koşullarda HIF-1 ekspresyonunun düzenlenmesini değiştirip yeni damar oluşumunda en önemli anjiogenik faktör olan VEGF ekspresyonunu uyararak anjiogenezi artırdığını, TNF- α tarafından uyarılan

pro-inflamatuar bir ortamda ise anjiogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir. HIF-1 α prolin hidroksilaz domain protein (PHD) gibi oksijen sensörleri ile düzenlenir. Normoksik durumda PHD, HIF-1 α alt birimlerini hidroksilleyerek proteozomal yıkım için hedef olmasını sağlar. Akut hipokside PHD inhibe olur ve HIF-1 α stabilizasyonuna yol açar.¹⁶⁵

Chen ve ark. TBH sonrası 1. ve 6. saatlerde oral yolla verdikleri 37,5 mg/kg simvastatinin bir gün sonra rat beyin dokusunda TLR4/ NF- κ B bağımlı inflamatuvar cevabı iyileştirdiğini gözlemlemişler ve bu mekanizmanın TBH'da simvastatinin koruyucu etkisinde rol alan mekanizmalardan biri olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹⁴¹ TNF- α , NF- κ B aktivasyonu ile HIF-1 α ve VEGF ekspresyonunu artırabilir.¹⁶⁶ Wu ve ark. tarafından yapılan deneysel bir çalışmada ratlara travmadan birgün sonra başlayıp 14 gün süreyle 1 mg/kg oral simvastatin verilmiş ve simvastatinin serum VEGF düzeylerini artırdığı saptanmıştır.¹⁴² Bizim çalışmamızda ise travmadan 3 saat sonra tek doz (1 mg/kg) simvastatin verilmiş ve 1 gün sonra alınan doku ve serum örneklerinde travma grubunda artan VEGF ve NO düzeylerinin azaldığı (p<0,05) gözlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda, hipoksik koşullar altında mikromolar konsantrasyonlardaki atorvastatinin VEGF mRNA'sının ya da proteininin değil de VEGF promoterinin transkripsiyonel aktivitesini artırdığı 1 μ M konsantrasyonlardaki simvastatinin ise hipoksi indüklü VEGF protein ekspresyonunu uyardığı saptanmıştır.^{165,167} Bu bulgular, statinlerin VEGF ekspresyonu üzerine farklı etkilerinin statin preparatlarına, hücre tiplerine ve hipoksinin derecesine bağlı olabileceğini göstermektedir.

Zhu ve ark. simvastatinin, TNF- α tarafından oluşturulan pro-inflamatuar ortamda VEGF'in inhibisyonuna neden olarak anjiogenezi önlediğini göstermiştir.¹⁶⁵ Çalışmamızda da travmadan 3 saat sonra verilen simvastatin tedavisi, travmatik beyin hasarından sonra ortaya çıkan inflamasyon ortamında VEGF düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca yapılan histopatolojik incelemede, simvastatin tedavisiyle nöronal hasar bulgularının (Resim-7), retraksiyon ball oluşumunun (Resim-7), diffüz aksonal hasarın, ödem oluşumunun (Resim-8), intraserebral kanama alanlarının (Resim-10) belirgin derecede azaldığı (p<0.05); vasküler konjesyonun ise azaldığı ancak travma grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu bulgulara göre TBH'da simvastatin tedavisinin diffüz aksonal hasara ait nöropatolojik değişiklikleri azaltarak beyin dokusunda iyileşme sağladığı söylenebilir.

TBH, son yıllarda SSS'nin nöroinflamatuvar bir hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Beyinde erken inflamasyonun göstergeleri aktive mikrogliaların, nötrofillerin ve ödemin bulunmasıdır.⁴⁴ Çalışmamızın histopatolojik bulguları, travma sonrası inflamatuvar yanıtın oluştuğunu göstermektedir (Resim-8). SSS'de, TBH'da inflamatuvar yanıtı neden olan

faktörlerden biri, bizim çalışmamızda da travma sonrası gözlenen VEGF artışıdır. TBH'nın erken döneminde VEGF artışının KKB'nin sızıntısını artırdığı bilinmektedir ve KBB'nin geçirimsizliğinin bozulması, iç doku bileşenleri ile devam eden nöroinflamasyon olarak adlandırılmaktadır.^{43,104} VEGF'in, vasküler permeabiliteyi artırmasının yanında, lökositlerin damar duvarına adezyonunu artırması ve intersellüler ve vasküler hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarması ile proinflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir.¹⁶⁸ Ayrıca TBH'da salınımı artan, çeşitli immün ve immün olmayan hücrelerden sistemik ve intratekal üretilen ve nöroinflamasyona aracılık eden sitokinler nöroinflamatuvar yanıtın varlığının bir göstergesidir.⁵² Deneysel diffüz beyin hasar modellerinde, beyin dokusunda ekspresyon olmadan 24 saat içinde proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın hasar alanını infiltre ettiği ve serumda düzeylerinin arttığı gösterilmiştir.⁵⁸ TBH'da oksidatif stresin kaynağı olarak çeşitli mekanizmalarla oluşumu artan ROT'da proinflamatuvar moleküllerdir. Bu çalışmada, oluşturulan akut beyin travmasından sonra ortaya çıkan oksidatif stresin hücresel düzeydeki bir göstergesi olan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinde artış gözlemlendi. Çalışmamızda, deneysel TBH'da, akut dönemde verilen simvastatin tedavisinin, kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, inflamasyon ortamında VEGF ve NO düzeylerini düşürerek, KBB sızıntısını ve vasküler hiperpermeabiliteye bağlı vazojenik beyin ödemi gelişimini önlediği düşünülebilir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda deneysel kafa travması sonrasında oluşan diffüz beyin hasarını sınırlayabilmek amacıyla, akut dönemde verilen düşük doz simvastatin tedavisinin nöroprotektif rolü araştırıldı. Kafa travması oluşturulduktan 3 saat sonra verilen 1 mg/kg/i.p. simvastatinin oksidatif hasarın hücresel düzeyde bir belirteci olan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan artmış MDA düzeylerini düşürdüğü, antioksidan kapasiteyi desteklediği gözlemlendi ve lipid peroksidasyonunu sınırlayabileceği düşünüldü. Ayrıca simvastatin tedavisinin, travma sonrası artan VEGF ve NO üretimini azaltarak patolojik anjiogenezi, serebral ödem oluşumunu önlediği ve inflamasyonu baskıladığı; çalışmamızın histopatolojik bulgularının da bu sonucu desteklediği kanısına varıldı.

Çalışmamızın sonuçları, akut travmatik beyin hasarında, düşük tek doz simvastatin tedavisinin lipid peroksidasyon, serebral ödem oluşumu, patolojik anjiogenez ve inflamatuvar yanıt gibi nöropatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri azaltarak sekonder travmatik beyin hasarına karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak simvastatinin insanlarda akut travmatik beyin hasarının tedavisinde yararlı bir seçenek olabileceğini düşünmekteyiz.

7. ÖZET

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA SİMVASTATİNİN AKUT DÖNEMDEKİ KORUYUCU ETKİSİ

Amaç: Travmatik beyin hasarı, primer ve sekonder hasar mekanizmalarını içerir. Sekonder hasar, saatler veya günler sonra ortaya çıkmakta ve birçok karmaşık fizyopatolojik mekanizmaya bağlı olarak oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda, statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız, oksidatif stresin ve inflamasyonun baskılanması gibi çok yönlü etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmamızda, ağır kapalı diffüz beyin travması oluşturulan ratlara, travma oluşturulduktan sonra akut dönemde düşük, tek doz simvastatin tedavisi verilerek simvastatinin nöroprotektif rolünün araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Erişkin erkek Wistar ratlar sham, travma, travma+çözücü ve travma+simvastatin olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deneysel olarak oluşturulan kafa travmasından 3 saat sonra 1mg/kg simvastatin intraperitoneal olarak enjekte edildi. 24 saat sonra anestezi altında intrakardiyak kan örnekleri alınan ratlar sakrifiye edilerek biyokimyasal ve histopatolojik analizler için beyin dokuları çıkartıldı. Deneklerden elde edilen serum örneklerinde total kolesterol, düşük dansiteli kolesterol, yüksek dansiteli kolesterol, malondialdehit, total antioksidan kapasite ve vasküler endotelial büyüme faktörü konsantrasyonları ölçüldü. Doku homojenatlarında malondialdehit, vasküler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit, total antioksidan kapasite düzeyleri ile süperoksit dismutaz aktivitesi çalışıldı.

Bulgular: Yapılan histopatolojik incelemede, simvastatin verilmesi ile travma grubu ile karşılaştırıldığında, nöropatolojik değişikliklerin azaldığı görüldü. Travmatik beyin hasarının, beyin dokusunda malondialdehit, vasküler endotelial büyüme faktörü ve nitrik oksit düzeylerinde önemli bir artışa neden olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Simvastatin tedavisi malondialdehit, vasküler endotelial büyüme faktörü ve nitrik oksit düzeylerini belirgin olarak azalttı ($p<0,05$). Simvastatin, total antioksidan kapasite düzeylerini ve süperoksit dismutaz

aktivitesini travma grubu ile karşılaştırıldığında artırmış olsa da, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları akut travmatik beyin hasarında, düşük tek doz simvastatin tedavisinin lipid peroksidasyon, serebral ödem oluşumu, patolojik anjiogenez ve inflamatuvar yanıt gibi nöropatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri azaltarak sekonder travmatik beyin hasarına karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak simvastatinin insanlarda akut travmatik beyin hasarının tedavisinde yararlı bir seçenek olabileceği düşünüldü.

Anahtar sözcükler: Travmatik beyin hasarı, diffüz aksonal hasar, simvastatin, vasküler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit.

8. SUMMARY

THE PROTECTIVE EFFECT OF SIMVASTATIN IN THE ACUTE PHASE OF EXPERIMENTAL HEAD TRAUMA

Background and Aim: Traumatic brain injury involves both primary and secondary mechanisms of injury. Secondary injury occurs in the hours to days following the primary insult and is typified by many of physiopathological mechanisms. Previous studies suggested that statins have pleiotropic effects, that are independent of their capability to lower cholesterol such as anti-inflammatory, and anti-oxidative effects. In our study, we performed to assess the neuroprotective role of a single low-dose simvastatin treatment in brain tissue of rats subjected to closed head trauma when given in acute phase of the trauma.

Methods: Adult male Wistar rats were divided into four groups as sham, trauma, trauma with vehicle, trauma with simvastatin. Simvastatin was injected intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg three hours after the experimental trauma. After 24 hours, intracardiac blood samples were obtained under anesthesia and than animals were sacrificed; brains were collected for biochemical and histopathological analyses. Malondialdehyde, vascular endothelial growth factor and total antioxidant status levels were measured in the serum. In the tissue homogenates malondialdehyde, vascular endothelial growth factor, nitric oxide, total antioxidant status levels and superoxide dismutase activity were measured.

Results: Upon histopathological evaluation; simvastatin reduced neuropathological changes in comparison with trauma grup. Traumatic brain injury induced a significant increase in malondialdehyde, vascular endothelial growth factor and nitric oxide levels ($p < 0.05$) in brain tissue. Simvastatin treatment markedly reduced malondialdehyde, vascular endothelial growth factor and nitric oxide levels ($p < 0.05$). Simvastatin increased total antioxidant status levels and superoxide dismutase activity in comparison with trauma group, but the differences were not statistically significant.

Conclusion: The results of our study suggest that, single low- dose simvastatin treatment reduced neuropathological and biochemical alterations such as lipid peroxidation, cerebral edema formation, pathological angiogenesis and inflammatory response in acute traumatic brain injury and it may be protective against secondary traumatic brain injury. Therefore simvastatin may provide a useful therapeutic option in humans for acute traumatic brain injury.

Key words: Traumatic brain injury, diffuse axonal injury, simvastatin, vascular endothelial growth factor, nitric oxide.

9. KAYNAKLAR

1. Maas AIR, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008;7:728–741.
2. Wang H, Lynch JR, Song P, Yang HJ, Yates RB, Mace B et al. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2007;206:59–69.
3. Smith DH, Chen XH, Xu BN, McIntosh TK, Gennarelli TA, Meaney DF. Characterization of diffuse axonal pathology and selective hippocampal damage following inertial brain trauma in the pig. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:822–834.
4. Gennarelli TA. Animate models of human head injury. *J Neurotrauma* 1994;11:357–368.
5. Eugene P, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped? *CMAJ* 2008;178:1163–1170.
6. Gentry LR. Imaging of Closed Head Injury. *Radiology* 1994;1:1–17.
7. Adekoya N, Majumder R. Fatal traumatic brain injury, West Virginia, 1989–1998. *Public Health Rep* 2004;119:486–492.
8. Peden M, McGee K, Sharma G. The injury chart book: a graphical overview of the global burden of injuries. Geneva, World Health Organization. 2002.
9. The World Report on Traffic Injury Prevention 2004. The Fundamentals, Chapter One, Geneva, 2004.
10. Karasu A, Sabancı P, Cansever T, Hepgül K, Imer M, Dolaş İ ve ark. Epidemiological study in head injury patients. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2009;15:159–163.
11. Ergüngör MF. Kafa travmalarında patofizyoloji. Aksoy K, Palaoğlu S, Pamir N, Tuncer N. *Temel Nöroşirürji. Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları*. 2005:298–305.
12. Marik PE, Varon J, Trask T. Management of head trauma. *Chest* 2002;122:699–711.
13. Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 1989;15:49–59.
14. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2005;2:410–422.
15. Fork M, Bartels C, Ebert AD, Grubich C, Synowitz H, Wallesch CW. Neuropsychological sequelae of diffuse traumatic brain injury. *Brain Inj* 2005;19:101–108.
16. Povlishock JT. Pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and man. *1993;22:980–986*.
17. Hatton J. Pharmacological Treatment of Traumatic Brain Injury: A Review of Agents in Development. *CNS Drugs* 2001;15:553–581.
18. Bauma GJ, Muizelar JP, Choi SC, Newlon PG, Young HF. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J Neurosurg* 1991;75:685–693.
19. Kocsis B, Fedina L, Pasztor E. Effect of preexisting brain ischemia on sympathetic nerve response to intracranial hypertension. *J Appl Physiol* 1991;70:2181–2187.
20. Marmarou A, Eisberg HM, Foulkes MA, Marshall LF, Jane JA. Impact of ICP instability and hypotension on outcome in patients with severe head trauma. *J Neurosurg* 1991;75:59–66.

21. Jain K.K. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discovery Today* 2006;13:1082–1089.
22. Buki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection? Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 2006;148:181–194.
23. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861–2874.
24. Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT. Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1999;16:511–521.
25. Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Neurosci* 2001;21:1923–1930.
26. Maxwell WL, Povlishock JT, Graham DL. A mechanistic analysis of nondisruptive axonal injury: a review. *J Neurotrauma* 1997;14:419–440.
27. Buki A, Farkas O, Doczi T, Povlishock JT. Preinjury administration of the calpain inhibitor MDL–28170 attenuates traumatically induced axonal injury. *J Neurotrauma* 2003;20:261–268.
28. Posmantur R, Kampfl A, Siman R, Liu J, Zhao X, Clifton GL, et al. A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 1997;77:875–888.
29. Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 2001;7:355–362.
30. Yi JH, Hazell AS. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int* 2006;48:394–403
31. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391–397.
32. Goforth PB, Ellis EF, Satin LS. Enhancement of AMPA-mediated current after traumatic injury in cortical neurons. *J Neurosci* 1999;19:7367–7374.
33. Isaac JT, Ashby M, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 2007;54:859–871.
34. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 2005;25:3219–3228.
35. Sensi SL, Jeng JM. Rethinking the excitotoxic ionic milieu: the emerging role of Zn(2+) in ischemic neuronal injury. *Curr Mol Med* 2004;4:87–111.
36. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992;5:834–842.
37. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 1999;31:651–669.
38. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481–487.
39. Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:287–294.
40. Arundine M, Aarts M, Lau A, Tymianski M. Vulnerability of central neurons to secondary insults after in vitro mechanical stretch. *J Neurosci* 2004;24:8106–8123.
41. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor*. 1998;9:259–275.

42. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991;28:254–260.
43. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 2001;16:165–177.
44. Kreutzberg G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;19:312–318.
45. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 1999;30:77–105.
46. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004;4:65–84.
47. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36:180–190.
48. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 1996;16:2508–2521.
49. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci* 1997;17:3664–3674.
50. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma* 1994;11:499–506.
51. Csuka E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport* 2000;11:2587–2590.
52. Lucas S, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006;147:232–240.
53. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 2005;22:885–895.
54. Rothwell N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav Immun* 2003;17:152–157.
55. Shiozaki T, Hayakata T, Tasaki O, Hosotubo H, Fuijita K, Mouri T, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early phase severe traumatic brain injury. *Shock* 2005;23:406–410.
56. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:119–130.
57. Kita T, Liu L, Tanaka N, Kinoshita Y. The expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat brain after fluid percussive injury. *Int J Legal Med* 1997;110:305–311.
58. Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. *J Trauma* 2006;60:152–157.
59. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315–325.
60. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia* 2000;32:271–285.
61. Hans VH, Kossmann T, Joller H, Otto V, Morganti-Kossmann MC. Interleukin-6 and its soluble receptor in serum and cerebrospinal fluid after cerebral trauma. *Neuroreport* 1999;10:409–412.

62. Herx LM, Yong VW. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:961–971.
63. Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O, et al. Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:184–194.
64. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *J Neuroimmunol* 2005;162:71–80.
65. Ransohoff RM, Tani M. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci* 1998;21:154–159.
66. Sherwood ER, Prough DS. Interleukin-8, neuroinflammation, and secondary brain injury. *Crit Care Med* 2000;28:1221–1223.
67. Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:280–289.
68. Stamatovic SM, Shakuji P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:593–606.
69. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49:577–587.
70. Potts MB, Koh S, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, et al. Traumatic Injury to the Immature Brain: Inflammation, Oxidative Injury, and Iron-Mediated Damage as Potential Therapeutic Targets. *NeuroRx* 2006;3:143–153.
71. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000;17:871–890.
72. Gutteridge JMC, Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000 A Historical Look to the Future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136–147.
73. Chang EF, Claus CP, Vreman HJ, Wong RJ, Noble-Haeusslein LJ. Heme regulation in traumatic brain injury: relevance to the adult and developing brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Nov;25:1401–1417.
74. Fujita T. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects. *Yakugaku Zasshi* 2002;122:203–218.
75. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57:715–725.
76. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:412–426.
77. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28:1283–1288.
78. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132–139.
79. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2005;109:227–241.
80. Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, et al. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci* 1998;18:3708–3714.
81. Gahm C, Holmin S, Mathiesen T. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. *Neurosurgery* 2000;46:169–177.

82. Gahm C, Holmin S, Rudehill T, Mathiesen T. Neuronal degeneration and iNOS expression in experimental brain contusion following treatment with colchicine, dexamethasone, tirilazad mesylate and nimodipine. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147:1071–1084.
83. Terpolilli NA, Zweckberger K, Trabold R, Schilling L, Schinzel R, Tegtmeier F. The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2009 Jun 10. [Epub ahead of print]
84. Leker RR, Shohamib E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews* 2002;39:55–73.
85. Lewén A, Fujimura M, Sugawara T, Matz P, Copin JC, Chan PH. Oxidative Stress–Dependent Release of Mitochondrial Cytochrome c After Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:914–920
86. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:819–834.
87. Natale JE, Knight JB, Cheng Y, Rome JE, Gallo V. Metallothionein I and II mitigate agedependent secondary brain injury. *J Neurosci Res* 2004; 78:303–314.
88. Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:1007–1019.
89. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277- 285.
90. Mikawa S, Kinouchi H, Kamii H, Gobbel GT, Chen SF, Carlson E, et al. Attenuation of acute and chronic damage following traumatic brain injury in copper, zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurosurg* 1996;85:885–891.
91. Sheng H, Bart RD, Oury TD, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 1999;88:185–191.
92. Hamm RJ, Temple MD, Pike BR, Ellis EF. The effect of postinjury administration of polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase (pegorgotein, Dismutec) or lidocaine on behavioral function following fluid-percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1996;13:325–332.
93. Yunoki M, Kawauchi M, Ukita N, Sugiura T, Ohmoto T. Effects of lecithinized superoxide dismutase on neuronal cell loss in CA3 hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Surg Neurol* 2003;59:156–160.
94. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med* 2008;45:443–452.
95. Fan P, Yamauchi T, Noble LJ, Ferriero DM. Age-dependent differences in glutathione peroxidase activity after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2003;20:437–445.
96. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Tauber MG, et al. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res* 2004;56:656–662.
97. Sarrafzadeh AS, Thomale UW, Kroppenstedt SN, Unterberg AW. Neuroprotective Effect of Melatonin on Cortical Impact Injury in the Rat. *Acta Neurochir (Wien)* 2000;142:1293–1299.
98. Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 2001;24:386–391.

99. Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Rev* 2001;37:320–334.
100. Mattson MP, Cheng B. Growth factors protect neurons against excitotoxic / ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke* 1993;24:136–140.
101. Lafuente JV, Argandoña EG, Mitre B. VEGFR-2 expression in brain injury: its distribution related to brain–blood barrier markers. *J Neural Transm* 2006;113:487–496.
102. Carmeliet P, Storkebaum E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:39–53.
103. Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:887–895.
104. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000;106:829–838.
105. Bao WL, Lu SD, Wang H, Sun FY. Intraventricular vascular endothelial growth factor antibody increases infarct volume following transient cerebral ischemia. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999;20:313–318.
106. Kaur C, Ling LC. Blood Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Conditions *Current Neurovascular Research* 2008;5:71–81.
107. Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* 2001;15:1218–1220.
108. Faden AI, Stoica B. Neuroprotection Challenges and Opportunities. *Arch Neurol* 2007;64:794–800.
109. Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci* 1999;65:1329–1337.
110. Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;58:719–731.
111. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002;16:508–519.
112. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2004;45:89–118.
113. Di Napoli P, Taccardi AA, Oliver M, De Caterina R. Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects. *Eur Heart J* 2002;23:1908–1921.
114. Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 2004;35:2708–2711.
115. McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, Sheng H, Pearlstein RD, Laskowitz DT, et al. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2002;33:2950–2956.
116. Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, et al. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21:21–32.
117. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 2003;58:743–751.
118. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefter DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004–1010.

119. Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, et al. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 1996;184:1425–1433.
120. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997;100:2671–2679.
121. Lorkowska B, Chlopicki S, Marcinkiewicz E, Gryglewski RJ. Statins rise cytoplasmic calcium level [Ca^{+2}] in cultured endothelial cells. *Pol J Pharmacol* 2004;56:313–318.
122. Dulak J, Józkowicz A. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Effects of Statins: Relevance to Anti-Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:579–594.
123. Mauro VF. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clin Pharmacokinet* 1993;24:195–202.
124. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981;211:67–77.
125. Foda MA, Marmarou A. A New model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 1994;80:301–313.
126. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994;80:291–300.
127. Iseri S, Ercan F, Gedik N, Yuksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology* 2007;230:256–264.
128. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:372-376.
129. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978;86:271–278.
130. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497–500.
131. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004;37:112–119.
132. Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2006;274:150–154.
133. Genescà J, Martí R, Rojo F, Campos F, Peribáñez V, González A. Increased tumour necrosis factor α production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* 2003;52:1054–1059.
134. Miller JD, Piper IR, Jone PA. Pathophysiology of head injury. Narayan RK, Wilberger JE, Povjishock JT (eds). *Neurotrauma*. McGraw Hill Company, New York 1996; pp: 61-70.
135. Essig M, Vrtovsni F, Nguyen G, Sraer JD, Friedlander G. Lovastatin modulates in vivo and in vitro the plasminogen activator/plasmin system of rat proximal tubular cells: role of geranylgeranylation and Rho proteins. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1377–1388.
136. Maeda T, Lee SM, Hovda DA. Restoration of cerebral vasoreactivity by an L-type calcium channel blocker following fluid percussion brain injury. *J Neurotrauma* 2005;22:763–771.
137. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756–1759.

138. Lu D, Mahmood A, Goussev A, et al. Atorvastatin reduces intravascular thrombosis, increases cerebral microvascular patency and integrity, and enhances spatial learning in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2004;101:819–827.
139. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circulation Research* 2002;90:737–744.
140. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, et al. Increase in phosphorylation of Akt and its downstream signaling targets and suppression of apoptosis by simvastatin after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2008;109:691–698.
141. Chen G, Zhang S, Shi J, Ai J, Qi M, Hang C. Simvastatin reduces secondary brain injury caused by cortical contusion in rats: possible involvement of TLR4/NF-kappaB pathway. *Exp Neurol* 2009;216:398–406.
142. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, et al. Simvastatin-Mediated Upregulation of VEGF and BDNF, Activation of the PI3K/Akt Pathway, and Increase of Neurogenesis Are Associated with Therapeutic Improvement after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2008;25:130–139.
143. Halliwell B, Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update. *FEBS Lett* 1992;3071:108–112.
144. Mattson MP. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: Roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* 1998;212:53–57.
145. Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA. Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurosurg* 1993;60:588–594.
146. Smith SL, Andrus PK, Zhang JR, Hall ED. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation and blood brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J Neurotrauma* 1994;11:393–403.
147. Yilmaz N, Dulger H, Kiymaz N, Yilmaz C, Gudu BO, Demir I. Activity of mannitol and hypertonic saline therapy on the oxidant and antioxidant system during the acute term after traumatic brain injury in the rats. *Brain Res* 2007;20:1164:132-135.
148. Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Sener M, et al. Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem* 2007;294:137-144.
149. Wilmore LJ, Rubin JJ. Effect of antiperoxidants on FeCl₂ induced lipid peroxidation and focal edema in rat brain. *Exp Neurol* 1984;83:62-70.
150. Williams LR. Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. *Cereb Brain Metab Rev* 1995;71:55–73.
151. Hicdonmez T, Kanter M, Tiryaki M, Parsak T, Cobanoglu S. Neuroprotective effects of N-acetylcysteine on experimental closed head trauma in rats. *Neurochem Res* 2006;31:473–481.
152. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1712–1719.
153. Wagner AH, Köhler T, Rückschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:61–69.
154. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2001;108:1429–1437.
155. Haendeler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidant Effects of Statins via S-Nitrosylation and Activation of Thioredoxin in Endothelial Cells A Novel Vasculoprotective Function of Statins. *Circulation* 2004;110:856–861.
156. Olanow CW. A Radical Hypothesis for Neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993; 16: 439–444.

157. Park E, Bell JD, Siddiq IP, Baker AJ. An analysis of regional microvascular loss and recovery following two grades of fluid percussion trauma: a role for hypoxia-inducible factors in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:575–584.
158. Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4591–4617.
159. Mayhan WG. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 1999;276:1148–1153.
160. Kaur C, Sivakumar V, Zhang Y, Ling EA. Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia* 2006;54:826–839.
161. Sköld MK, von Gertten C, Sandberg-nordqvist AC, Mathiesen T, Holmin S. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma* 2005;22:353–367.
162. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2604–2609.
163. Chade AR, Zhu X, Mushin OP, Napoli C, Lerman A, Lerman L. Simvastatin promotes angiogenesis and prevents microvascular remodeling in chronic renal ischemia. *FASEB J* 2006;20:1706–1708.
164. Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, Holmes JR, Napoli DR, Ritman C, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation* 2002;105:415–418.
165. Zhu XY, Daghini E, Chade AR, Lavi R, Napoli C, Lerman A, et al. Disparate effects of simvastatin on angiogenesis during hypoxia and inflammation. *Life Sci.* 2008;83:801–809.
166. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 2003;370:1011–1017.
167. Loboda A, Jazwa A, Jozkowicz A, Molema G, Dulak J. Angiogenic transcriptome of human microvascular endothelial cells: effect of hypoxia, modulation by atorvastatin. *Vascul Pharmacol* 2006;44:206–214.
168. Proescholdt MA, Heiss JD, Walbridge S, Muhlhauser J, Capogrossi MC, Oldfield EH, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:613–627.

10. RESİMLEMELER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil-1. Sekonder hücre hasarında gelişen hücresel mekanizmalar.	7
Şekil-2. TBH'dan sonra oksidatif hasar mekanizmaları.	14
Tablo-1. Kafa travmasında yapılan çalışmalar.	22
Şekil-3. Kafa travmasında çalışılan farmakolojik ajanların etki mekanizmaları.	23
Şekil-4. Mevalonat yolu.	24
Şekil-5. Simvastatinin moleküler yapısı.	25
Resim-1. Orta hatta koronal ve lambdoid sütürler arasına 10mm çapında 3mm kalınlığında çelik disk konulması	31
Resim-2. Marmarou ve arkadaşları tarafından tarif edilen akselerasyon travma modeli.	32
Resim-3. Deneklerin sırt üstü yatırılarak intrakardiyak kan alınması.	33
Resim-4. Deneklerin dekapitasyon ile beyin ve beyin sapının bir bütün halinde çıkarılması sonrası elde edilen doku örneği (S grubundan)	33
Şekil-6. Doku MDA standart eğrisi.	39
Şekil-7. Serum MDA standart eğrisi.	39
Şekil-8. SOD standart eğrisi.	41
Şekil-9. VEGF standart eğrisi.	44
Şekil-10. NO standart eğrisi.	46
Tablo-2. Deneklerin travma öncesi (0. Saat) ölçülen fizyolojik parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması.	48
Tablo-3. Deneklerin travma sonrası (24. Saat) ölçülen fizyolojik parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması.	48
Tablo-4. Beyin dokularının hemotoksilen-eosin ile boyanan histolojik doku kesitlerinden elde edilen bulguların gruplara göre dağılımı.	49
Tablo-5. Beyin dokularının histopatolojik incelemesinden elde edilen yüksek skorların (skor2 + skor 3) gruplara göre dağılımı.	49
Resim-5. Sham- grubu. Normal nöronal dağılım (H&Ex400).	50

Resim-6. Travma+simvastatin: Nöronlarda normal histopatolojik bulgular, seyrek retraksiyon ball oluşumu-(H&E400).	50
Resim-7. Travma grubu: Ağır nöronal hasar, retraksiyon (DAH)-Skor 3 (H&Ex400).	51
Resim-8. Travma grubu: Yoğun ödem-Skor 3 (H&Ex200).	52
Resim-9. Travma+simvastatin: Ödem-Skor 2 (H&Ex200).	52
Resim-10. Travma grubu: Yoğun intraserebral kanama – Skor 3 (H&Ex200).	53
Tablo-6. Deneklerin serum TK, LDL-K ve HDL-K düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.	53
Tablo-7. Beyin dokusu ve serumda ölçülen MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.	54
Grafik-1. Serumda ölçülen MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	54
Grafik-2. Beyin dokusunda ölçülen MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	55
Tablo-8. Beyin dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin gruplar arası karşılaştırması.	55
Grafik-3. Beyin dokusunda ölçülen SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı.	55
Tablo-9. Beyin dokusu ve serumda ölçülen TAS düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.	56
Grafik-4. Beyin dokusu ve serumda ölçülen TAS düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	56
Tablo-10. Beyin dokusu ve serumda ölçülen VEGF düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.	57
Grafik-5. Beyin dokusu ve serumda ölçülen VEGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	57
Tablo-11. Beyin dokusunda ölçülen NO düzeylerinin gruplar arası karşılaştırması.	58
Grafik-6. Beyin dokusunda ölçülen NO düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	58

11. ÖZGEÇMİŞ

07.07.1979 tarihinde Manisa'da doğdum. İlköğrenimimi Ahmetli Gazi İlk Öğretim Okulu'nda; Orta ve lise öğrenimimi Turgutlu Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında başladığım Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 01.12.2004 tarihinde tıpta uzmanlık eğitimime başladım. Orta derecede İngilizce bilmekteyim. Eğitim sürem boyunca çeşitli ulusal kongre ve kurslara katıldım ve 14 adet yurt içi kongrelerde sunulan bildiride; 2 adet yurt dışı ve 3 adet yurt içi dergide makale olarak yayınlanan bilimsel çalışmada yer aldım.

12. EKLER

1. Etik Kurul Onayı.
2. Düzce Üniversitesi Rektörlüğü - Bilimsel Araştırma Projesi Komisyon Başkanlığı - Sözleşme.



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL ALT KURULU

Tarih: 07.03.2008

No: 100/2

Sayın Dr. Özlem YAVUZ ,

Aşağıda belirtilen araştırmanız Etik Kurulumuz tarafından ilgili yönetmelik ve yönergeler uyarınca evrensel etik kurallar çerçevesinde değerlendirilmiş ve oybirliği ile "uygun" bulunarak Etik Komite onayı verilmiştir.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr. Ayşe Demet KAYA
Başkan

Protokol No: 100/2

Araştırmanın Adı: Deneysel ağır kafa travomasında statinlerin nörobiyokimyasal belirteçlere etkisi



**DUZCE UNIVERSITY
MEDICAL SCHOOL
LOCAL ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL STUDIES**

March,07,2008

To whom it may concern,

**The following study cited below has been approved by the Local Ethical
Committee of Duzce Medical School.**


**Ayşe Demet KAYA, M.D.
Chief of the Committee**

Reference:100/2

**Title:The effect of statins on neurobiochemical markers in experimental
traumatic brain injury**



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ KOMİSYON BAŞKANLIĞI
SÖZLEŞME

(EK-4)

Taraflar arasında 2547 sayılı kanunun değişik 58. maddesine göre kurulan Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ita amiri **REKTÖR Prof. Dr. Funda SİVRİKAYA ŞERİFOĞLU** ile proje yöneticisi sıfatı ile hareket eden **Doç. Dr. Özlem YAVUZ** arasında aşağıdaki şartlarla bir araştırma projesi destekleme sözleşmesi yapılmıştır.

Sözleşmede Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu kısaca Komisyon, **Doç. Dr. Özlem YAVUZ** dan kısaca proje yöneticisi diye anılacaktır.

SÖZLEŞMENİN KONUSU

1. Bu sözleşmenin konusu, ekli araştırma projesi öneri ve değerlendirme formunda ayrıntıları belirtilmiş olup; " **Deneyisel Ciddi Kafa Travmasında Statinlerin Nörobiyokimyasal Belirteçlere Etkisi** " adlı projenin komisyon tarafından bu protokolda gösterilen şekilde desteklenmesidir.

PROJE YÖNETİCİSİNİN GÖREVLERİ

2. Projenin Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri esaslarına bağlı kalarak sözleşmeye ekli araştırma projesi öneri formunda belirtilen program içinde, sözleşmedeki süre, amaç ve şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yürütücüsü sorumludur. Desteklenmesi kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program ve bütçesinde komisyonun yazılı izni olmaksızın hiçbir değişiklik yapılamaz.

ARAÇ, GEREÇ VE DONATIM

3. Projeye tahsis edilen teçhizat; proje bütçesi içinde komisyon tarafından yurt içinden veya dışından temin edilerek projeye tahsis edilen, sarf malzemesi dışındaki, demirbaş niteliğinde olan her türlü teçhizat ayniyat kaydına alınarak kullanan kişiye zimmetlenir, proje bitiminde proje kapsamında alınan malzeme sağlam ve kullanılabilir biçimde ilgili birimin ayniyat mutemedine teslim edilir.

GELİŞME RAPORLARI

4. Proje yürütücüsü projenin devamı süresinde her altı ayda bir çalışmaların gidişi ve harcama durumlarıyla ilgili bir gelişme raporu ve ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri komisyona vermekle yükümlüdür. Gelişme raporları üç nüsha olarak verilir. Komisyon gerekli görülürse, komisyon başkanı projeye ilgili çalışmalarını çalışma yerinde inceleyebilir veya inceletebilir. Bu durumda proje yürütücüsü proje ile ilgili her türlü teknik, idari ve mali bilgileri ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla görevlidir.

KESİN RAPOR

5. Proje yöneticisi projenin sona ermesini izleyen üç ay içerisinde tüm araştırma sonuçlarını içeren kesin raporu komisyona verir. Ayrıca araştırma devam ederken bilimsel toplantılara sunulan bildiri metinleri ile varsa ara yayınların birer örneği de sunulur. Proje sonuçları ile ilgili yayın yapılmamış ise hazırlanan bilimsel makale ve daha sonra yayınlanmış ya da kabul edilmiş şeklinin bir nüshası kesin rapora eklenir.

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

6. Proje yöneticisi, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından gerekli her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından sorumludur.

GİZLİLİK

7. Proje yöneticisi, proje ile ilgili olarak elde edilecek bilgilerinin gizliliğinin korunması bakımından komisyona karşı sorumludur. Ulusal güvenlik, milli ekonomi ve ülke çıkarları aleyhine kullanılacak proje sonuçları üzerinde proje yürütücüsü ve yardımcısı araştırmacılar tarafından haber ya da beyanat verilemez ve yayın yapılamaz.

PERSONEL

8. Projede çalışacak yardımcı personel ile araştırmacılar proje yöneticisi tarafından seçilir.

MUTEMET ELİ İLE HARCAMALAR

9. Harcamalar proje yöneticisi ya da yetkili kılınan kişi tarafından alınacak avanstı, kanıtlayıcı evrak karşılığı yapılır. Verilen bu avansın usulüne uygun mahsubu yapılmadan yeniden avans verilemez.

PATENT HAKLARI

10. Komisyonca desteklenmek sureti ile ele alınan bu projenin sonucunda 17.7.1963 tarih ve 278 sayılı kanunun 2/a maddesine göre bir ihtira meydana gelirse bu ihtira aynı kanunun 21. maddesi uyarınca Düzce Üniversitesi 'ne ait olacaktır. Ancak Düzce Üniversitesi bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edeceği patenti satma yahut kiralama yoluyla elde edeceği bedel yahut kiranın %30'u ihtirayı yapan veya yapanlara verilecektir.

TELİF HAKLARI

11. Projeden elde edilen bilimsel sonuçların telif hakkı Düzce Üniversitesi 'ne aittir.

DESTEK MİKTARI

12. Projeyi desteklemek amacı ile komisyon tarafından ayrıntıları protokolde ekli araştırma projesi öneri formunda gösterilen toplam **3.947,62 TL.** (**Üçbindokuzyüzkırkyedi Türk Lirası Altmışiki Kuruş**) destek sağlanacaktır.

ÖDEMENİN KESİLMESİ

13. Sözleşme gereğince yapılan ödemelerin, proje amaç ve programını sözleşme şartlarının uygun olarak kullanılmadığı; gelişme raporlarının istenen ayrıntılı bilgilerden, yapılan incelemelerden anlaşılırsa veya proje gelişme raporları yapılan hatırlatmaya rağmen zamanında verilmez ise başkaca ihbara lüzum kalmadan sözleşme gereğince yapılan ödemeler her zaman durdurulabilir. Başka talepler saklı kalmak üzere verilmiş araç, gereç ve donatım derhal geri alınır ve komisyonca gerekli görüldüğü takdirde proje güdümlü olarak başka bir araştırmacıya veya araştırma grubuna verilebilir. Projenin bu yolla sonuçlanması ile sağlanacak yararlıardan proje ile ilişkisi kesilenler hiçbir hak talep edemezler.

YAZIM KURALLARI

14. Projenin kesin raporu, ilgili "Enstitü Tez Yazım" kuralları dikkate alınarak yazılacaktır.

YÜRÜRLÜK SÜRESİ

15. Bu protokol **05.01.2009** tarihinden **05.01.2010** tarihine kadar yürürlüktedir.



SÖZLEŞMENİN UZATILMASI

16. Sözleşme süresinin uzatılması, uzatmanın proje yöneticisi tarafından sözleşme süresinin bitimi tarihinden iki ay önce komisyona teklif edilmesine ve uygun görülmesine bağlıdır. Proje ile ilgili olarak yurt içi ya da yurt dışından satın alınması öngörülen malzemenin sağlanmasından dolayı geçen zaman proje süresine eklenir.

ADRES DEĞİŞİKLİĞİ

17. Bu protokol ile ilgili yazışma ve tebligat iş adresine veya bildirecek adrese yapılır. Proje yürütücüsü adresini değiştirdiği takdirde bunu en geç 10 gün içinde komisyona bildirmeye mecburdur. Adres değişikliği bildirilmezse eski adrese gönderilen yazı ve tebligat o adrese yapılmış sayılır.

SÖZLEŞME GİDERLERİ

18. Sözleşme giderleri Düzce Üniversitesi tarafından ödenir.

YETKİLİ MERCİ

19. Anlaşmazlık halinde yetkili merci Düzce Mahkeme ve İcra daireleridir.



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRÜ
Prof. Dr. Funda SİVRİKAYA ŞERİFOĞLU



PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ
Doç. Dr. Özlem YAVUZ