

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL KAFA TRAVMASI MODELİNDE
TRAVMANIN ŞİDDETİNE VE ZAMANA
BAĞIMLI OLARAK PLAZMADA VE BEYİN
DOKUSUNDA GUANAZ, SÜPEROKSİD
DİSMUTAZ VE KATALAZ AKTİVİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

102913
T 102913

Uzmanlık Tezi
Dr. Mine KUCUR

İSTANBUL-2001

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.



Proje No: T-679/280699

TEŞEKKÜR

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anabilimdalı'nda uzmanlık eğitimim süresince bana her konuda manevi destek veren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, Sayın hocam Prof. Dr. Gülden BURÇAK'a;

Uzmanlık eğitimimin başından beri her türlü bilgi ve desteğinden yararlandığım ve kendisini her konuda örnek aldığım değerli danışmanım, Sayın hocam Doç. Dr. Ahmet BELCE'ye;

Uzmanlık eğitimim süresince büyük katkıları olan Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki sayın hocalarım Prof. Dr. Emine KÖKOĞLU, Prof. Dr. Safiye KAYA, Prof. Dr. Tülay AKÇAY, Prof. Dr. Orkide DONMA, Prof. Dr. Hüseyin SÖNMEZ, Prof. Dr. Emel ZENGİN, Prof. Dr. Arzu SEVEN, Doç. Dr. Koray GÜMÜŞTAŞ, Doç. Dr. Dildar KONUKOĞLU ve Doç. Dr. Ezel USLU'ya;

Çalışmalarım sırasında her konuda bana yardımcı olan uzmanlarım ve asistan arkadaşlarıma;

Deney hayvanlarının temininde ve çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen İ.Ü. Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarı sorumlusu Sayın hocam Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a;

Tez çalışmalarım katkılarından dolayı Nöroşirurji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Mustafa UZAN, Sayın Doç. Dr. Mehmet Yaşar KAYNAR, Sayın Dr. Reza DASHTİ ve Sayın Dr. Taner TANRIVERDİ'ye; Biyoistatistik Bilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Ahmet DİRİCAN'a;

Eğitimim boyunca sevgi, güven ve anlayışla bana her zaman destek olan, bugünlere gelmemi sağlayan anneme, babama ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen kardeşim Murad'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

KISALTMALAR

MSS	: Merkez sinir sistemi
SOD	: Süperoksid Dismutaz
Cu, ZnSOD	: Bakır ve çinko içeren Süperoksid Dismutaz
Fe SOD	: Demir içeren Süperoksid Dismutaz
EC-SOD	: Ekstrasellüler Süperoksid Dismutaz
CAT	: Katalaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
O₂^{•-}	: Süperoksid radikali
OH^{•-}	: Hidroksil radikali
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
LOOH	: Lipid hidroperoksidleri
GSH	: Glutasyonun indirgenmiş şekli

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	3
II.1. Kafa Travması	3
II.2. Oksidatif Hasar ve Kafa Travması	6
II.3. Guanaz.....	9
II.4. Süperoksit Dismutaz	12
II.5. Katalaz.....	16
III. GEREÇ VE YÖNTEM	18
III.1. Kullanılan Alet ve Cam Malzemeler.....	20
III.2. Kimyasal Maddeler.....	21
III.3. Kimyasal Çözeltiler.....	21
III.4. Yöntemler.....	22
III.5. Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	27
IV. BULGULAR	28
V. TARTIŞMA	36
VI. ÖZET	42
VII. SUMMARY	43
VIII. KAYNAKLAR	44
IX. ÖZGEÇMİŞ	55

GİRİŞ VE AMAÇ

Canlı organizmaların tümü oksidatif stresden etkilenir fakat hayvan beyнинin oksidatif hasara özellikle daha hassas olduğu bildirilmiştir. Bunun bir nedeni beynin oksijen tüketiminin yüksek oluşudur. İnsanda vücut ağırlığının sadece küçük bir oranını oluşturan beyin bazal oksijen tüketiminin yaklaşık olarak % 20 'sini kullanır (36).

Travma sonrası MSS'de meydana gelen hasarın çoğu glutamat eksitotoksitesisi, Ca^{+2} birikimi ve oksidatif stresin sekonder etkileriyle oluşur. Birbirleriyle etkileşim gösteren bu üç mekanizma nöron ölümüyle sonlanır. Oksidatif stresin aktiflediği mekanizmalar nötrofil aracılı enflamasyona neden olur. Bu da sekonder hasara yol açar. Oksidatif stresin azaltılmasının travmaya bağlı sekonder hasarın miktarını büyük ölçüde azaltacağı ileri sürülmektedir (43).

Sekonder hasarın hemen hemen her mekanizmasında bir dereceye kadar serbest radikaller oluşur. Endotel hücrelerine serbest radikallerin hasarı kan-beyin bariyerini bozar ve doğrudan doğruya beyin parankimal hücrelerine zarar vererek nöronlarda ve gliada yapısal değişikliklere ve ödeme neden olurlar (32).

Guaninin ksantine dönüşümünü katalizleyen guanaz, oksidan bir enzim olan ksantin oksidaz içeren dokularda antioksidan özellikte bir molekül olan ürik asidin indirekt kaynağını oluşturur (49,55,57,62,121). Literatürde kafa travmasında bu enzimle ilişkili çalışma bulunmamaktadır.

Serbest radikaller vücutta normal olarak antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz), antioksidan küçük molekülleri (E vitamini, C vitamini, karotenler, flavanoidler, glutatyon, ürik asit ve taurin) ve selenyum, çinko gibi eser elementleri kapsayan etkili sistemlerle nötralize edilirler (19,99).

Literatürde kafa travmasında serbest oksijen radikalleriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Deneysel modellerin çoğu soğuk hasar veya sıvı perküzyonu gibi teknikler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Marmarou'nun impakt-akselerasyon modeli kullanılarak oluşturulan yaygın beyin hasarında guanaz, süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin plazma ve beyin dokusu aktivitelerini zamana ve travma şiddetine bağlı olarak değerlendirmeyi amaçladık.



II. GENEL BİLGİLER

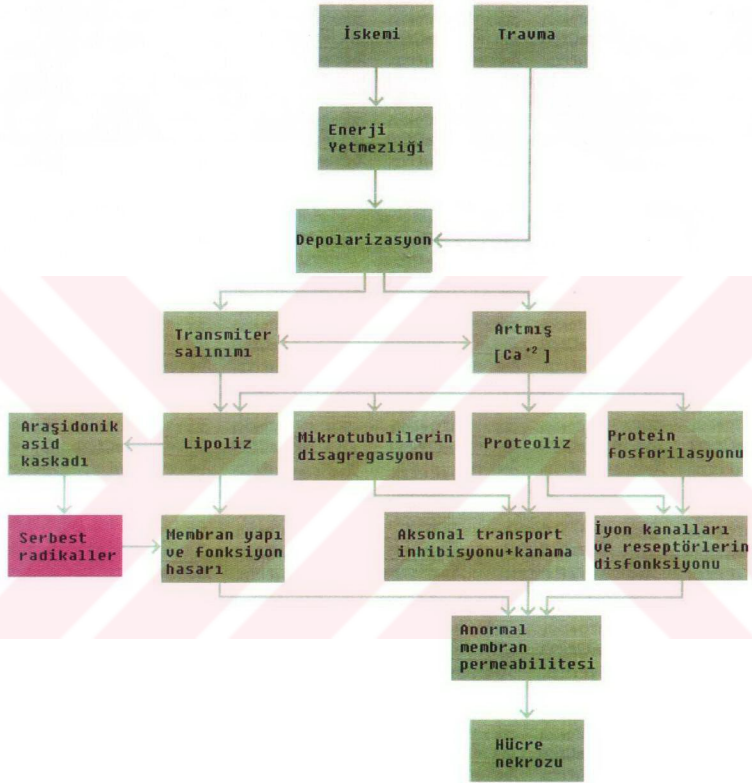
II.1. Kafa Travması

Kafa travması, sakatlık ve mortalitenin en önemli nedenlerinden birini oluşturur. ABD’de her yıl yaklaşık olarak 10 milyon kişinin kafa travmasına maruz kaldığı bildirilmiştir. Bunun %20’si beyinde hasara yol açabilecek düzeydedir (95). Gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında serebrovasküler hastalıklar 100 binde 794 prevalansla kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (48). Genellikle bu hasarlar uzun ve oldukça masraflı bir hastane tedavisini gerektirir. Bu durum hem kişi hem de ülke ekonomisine ağır bir yük getirir.

Travma sonrası hasar primer ve sekonder mekanizmalar aracılığıyla oluşur. Mekanik faktörler primer hasara neden olurlar. Primer hasar genel olarak serebral konfüzyonlar ve yaygın aksonal hasarlarla ilişkilidir. Böyle bir hasarın en belirgin işaretleri serebral korteksin giral kısımlarının hemorajik kontüzyonlarıdır. Hemorajinin boyutu tüm kortekse kadar uzanabilir, geniş kontüzyonlar birleşebilir ve kafa içerisinde pıhtı oluşturabilir. Şiddetli hasarda ise beyin kökü hasarı subaraknoid boşluğa yayılabilir. Primer hasarın etkilerini sekonder hasarlar artırır. Kafa travmalı her hastada belli bir dereceye kadar iskemi, hemoraji, ödem ve enflamasyon gelişir. Kafatası fraktürüne kraniyal sinirlerin hasarı, konküzyon, kontüzyonlar, hemoraji ve hematomlar eşlik edebilir (32).

Kafa travmasının en belirgin özelliklerinden biri olan sekonder bilinç değişikliklerinin ekstradural veya intradural hematoma, subaraknoid hemoraji, ödem veya vasküler dilatasyon, enfeksiyon, hidrosefali, hipoksi veya hipotansiyona bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir (79).

Sekonder hasar prosesi, bazı mekanizmaların birbiriyle karmaşık bir etkileşimini kapsamaktadır. Elde edilen bulgulara göre burada esas rol oynayan faktörlerin; eksitator



Şekil 2. İskemi ile depolarizasyon, kalsiyum homeostazının kaybı ve hücre ölümüne yol açan diğer olaylar arasındaki ilişki (105).

II.2. Oksidatif Hasar ve Kafa Travması

Canlı organizmaların tümü oksidatif stresden etkilenir fakat hayvan beyninin oksidatif hasar özellikle daha hassas olduğu bildirilmiştir. Bunun bir nedeni beynin oksijen tüketiminin yüksek oluşudur. İnsanda vücut ağırlığının sadece küçük bir oranını oluşturan beyin bazal oksijen tüketiminin yaklaşık olarak %20'sini kullanır (36). Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon normal koşullarda moleküler oksijenin suya tetralan indirgenmesi ile ilerler. Elektron akışının %1'i süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşumu ile sonuçlanır (39). Serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşumu; mitokondriyal solunum zinciri, fagositoz, araşidonik asid metabolizması, ovülasyon ve fertilizasyon gibi normal hücresel metabolizmanın integral bir özelliğidir. Bununla beraber patolojik olay sırasında SOR oluşumu artış gösterebilir. SOR, ya ekstrasellüler matriks üzerine veya doğrudan doğruya hücre membranları üzerine etki eder. En reaktif form olan hidroksil radikali (OH^{\bullet}); proteinleri, lipidleri ve nükleik asidleri oksitleyebilir (116,63).

$O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri merkez sinir sisteminin (MSS)'nin fonksiyonu sırasında metabolik reaksiyonlar sonucu oluşur (17). Reaktif oksijen türlerinin beyin hasarının patofizyolojisinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (2,45,101,116).

Kontos HA ve Poxlishock JT (51,52) oluşturdıkları kafa travma modelinde beyin hasarını takiben hemen ve bir saat sonra beyin ekstrasellüler kısmında $O_2^{\bullet-}$ 'ni saptamışlardır. Kafa travmasında beyinde OH^{\bullet} oluşumu da artmış bulunmuştur (29).

Travma sonrası MSS'de meydana gelen hasarın çoğu glutamat eksitotoksitesisi, Ca^{+2} birikimi ve oksidatif stresin sekonder etkileriyle oluşur. Birbirleriyle etkileşim gösteren bu üç mekanizma nöron ölümüyle sonuçlanır. Oksidatif stresin aktiflediği mekanizmalar nötrofil aracılı enflamasyona neden olur. Bu da sekonder hasara yol açar.

Oksidatif stresin azaltılmasının travmaya bağlı sekonder hasarın miktarını büyük ölçüde azaltacağı ileri sürülmektedir (43).

Sekonder hasarın hemen hemen her mekanizmasında bir dereceye kadar serbest radikaller oluşur. Endotel hücrelerine serbest radikallerin hasarı kan-beyin bariyerini bozar ve doğrudan doğruya beyin parankimal hücrelerine zarar vererek nöronlarda ve gliada yapısal değişikliklere ve ödeme neden olurlar. Kan beyin bariyerinin bozulması, vazojenik beyin ödemi oluşumundan ve beyin hücrelerinin kanamaya maruz kalmasından sorumludur (32). Kafa travmasında meydana gelen serebrovasküler yapı ve fonksiyon bozuklukları üzerine SOR aracılı lipid peroksidasyonunun katkıda bulunduğunu gösteren deney hayvanlarından ve bazı klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar bulunmaktadır. Travma sonrası beyinde lipid peroksidasyon düzeyi yüksek bulunmuştur ve travmanın şiddetiyle lipid peroksidasyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir (10,30,31,33,34,42,77,83,112,113,124).

Serbest radikal; nükleik asitler (DNA, RNA), proteinler veya lipidlerden bir elektron alma eğilimindedir. Bununla beraber sekonder MSS hasarı prosesi sırasında oluşan serbest radikallerin primer hedefleri hücre membranı fosfolipidlerinin poliansatüre yağ asitleridir (32).

Yaygın olarak kullanılan serbest radikal oluşturuıcı bir sistemle in vitroda beyin dokusu üzerinde hücre hasarı ve ödem indüklendiğinde membran fosfolipidlerinin parçalandığı, lipid peroksidasyonunun ve serbest yağ asitlerinin salınımının arttığı gösterilmiştir (12). Serbest poliansatüre yağ asitlerinin beyin ödeminin indüksiyonunu artırmaktadır (8,9,59). Buna göre SOR membran yapısında bozukluğa neden olabilir (11).

İskemi veya travmaya bağlı doku hasarı metal iyonlarının açığa çıkmasına ve serbest radikal reaksiyonlarının hızlanmasına neden olabilir. Bu durum özellikle

beyinde çok önemlidir. Çünkü beyin dokusu demir iyonlarından zengindir ve beyin omurilik sıvısı (BOS) salınan demir iyonlarını bağlayamaz. Demirin MSS'de bölgesel dağılımı bu bölgelerin in vitroda lipid peroksidasyonuna sensitivitesi ile paralel bir değişiklik göstermektedir (37,125). Travmayı takiben veya post iskemik reperfüzyon sırasında serbest radikal oluşumunda görülen patlama vasküler, nöronal ve glial hücrelerin fosfolipidlerindeki doymamış acil zincirleri üzerinde serbest radikal hasarı meydana getirir. Demir kataliziyle diğer zararlı radikal türleri oluşur ve demirin düşük molekül ağırlıklı bileşiklere bağlanması da pro-oksidan moleküllerin oluşumuna yol açar (105).

Mekanik travmadan kaynaklanan kanama ile subaraknoid veya intraserebral kanama sonucu açığa çıkan hemoglobin katalitik olarak aktif ikinci bir demir kaynağı oluşturur. Hemoglobin oksijen radikal reaksiyonlarını stimule edebilir. Bununla beraber hemoglobinden salınan demirin hemoglobin aracılı lipid peroksidasyonundan daha fazla sorumlu olduğu görülmektedir. pH'nın 6,5 veya daha aşağıya düşmesi H_2O_2 veya lipid hidroperoksidleri (LOOH) tarafından hemoglobinden demir salınımını artırır. Böylece hemoglobin oksijen radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu ya doğrudan doğruya veya H_2O_2 , LOOH, asidik pH etkisiyle demir salınımı yolu ile katalizleyebilir. LOOH'nin demir ile reaksiyonu için optimum pH asidik olup, doku hasarı sonrası meydana gelen asidoz lipid peroksidasyonunu artırır (32).

Nöronal, glial ve vasküler hücre membranları ile myelinin radikal aracılı peroksidasyonu ya düşük doku pH'ı ya da oksijen radikalleri aracılığı ile hemoglobin, transferrin ve ferritinden açığa çıkan serbest demir tarafından katalizlenir. Lipid peroksidasyonu hücrede membran yüzeyine yayılan, fosfolipid bağımlı enzimleri inhibe eden, iyon gradiyentlerini bozan ve eğer şiddetli ise membran lizisine yol açan geometrik olarak ilerleyen bir prosesdir (32).

Son yıllarda travmatik beyin hasarı sonrası beyin metabolizmasındaki patofizyolojik değişikliklerle ilişkili bilgimiz oldukça artmıştır. Nöronların akut farmakolojik korunmasında lipid peroksidasyonu önemli bir terapötik hedefdir (30,33). Bu durum beyin hasarı olan hastalarda sekonder beyin hasarını azaltmak amacıyla ek bir tedavi için spesifik farmakolojik stratejiler geliştirilmesini sağlamıştır. Travmatik beyin hasarının tedavisinde bazı maddeler incelenmiş olup, farklı evrelerde deneysel ve klinik değerlendirilmeleri yapılmaktadır (54).

Guaninin ksantine dönüşümünü katalizleyen guanaz, oksidan bir enzim olan ksantin oksidaz içeren dokularda antioksidan özellikte bir molekül olan ürik asidin indirekt kaynağını oluşturur (49,55,57,62,121). Literatürde kafa travmasında bu enzimle ilişkili çalışma bulunmamaktadır.

Sekonder beyin hasarı yüksek mortalite ve morbidite hızları ile ilişkilidir. Sekonder hasarın geriye dönüşlü nedenleri, hipoksemi, hipotansiyon ve intrakraniyal basınç artışı dahil mümkün olduğunca değerlendirilip, önlenilebilmelidir. Ayrıca gecikmiş beyin hasarı ile ilişkili hücrel ve metabolik değişiklikleri anlama ve hasarın önlenmesinde nöroprotektif ajanların rolü nörolojik bulguların iyileştirilmesinde ümit verici sonuçlara yol açacaktır (17,32).

II.3. Guanaz

Guanaz (Guanin deaminaz = Guanin aminohidrolaz, E.C.3.5.4.3) katabolik bir enzimdir. Guaninin ksantin ve amonyağa dönüşümünü katalizler (57). Bakteriler, böcekler ve memelilerin çoğunda guanaz aktivitesi saptanmıştır (14,20,92). Guanaz ekspresyonu türlere bağlı olarak dokular arasında değişiklikler göstermektedir (60,100). Genel olarak karaciğer, böbrek, beyin, ince ve kalın barsakta en yüksek aktivite bulunmuştur (41,65,78). Köpek, tavşan ve insan eritrositlerinde guanaz aktivitesi bulunmazken fare, sıçan ve hamsterlerin eritrositlerinde yüksek miktarda

aktivite saptanmıştır. Tavşan ve insanda kalpte guanaz aktivitesi bulunmazken; fare, sıçan, harmster ve köpekte orta düzeyde enzim aktivitesi bulunur (62). Sıçanların eritrositlerinde özellikle retikulositlerinde bulunmaktadır. Hatta guanaz düzeyi sıçanlardaki retikülositozun derecesini tahmin etmede kullanılabilir. Oysa insan eritrositlerinde hatta retikülositoz durumunda bile guanaz aktivitesi hemen hemen hiç yoktur. İnsanda guanaz başlıca karaciğer, beyin ve böbrekte bulunur. Diğer dokularda aktivite az veya yoktur (38,41).

Sıçan beyin guanazı amonyum sülfat fraksiyonlama tekniği, kolon kromatografisi ve jel filtrasyonu teknikleri ile saflaştırıldığında molekül ağırlığını 105 bin Dalton; SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile alt biriminin molekül ağırlığının 152 bin Dalton olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulara göre doğal enzim iki identik alt birimden ibarettir (81).

Tavşan beyninden izole edilen guanazın amino asid analizi yapıldığında bol miktarda serin, glisin ve lösin, düşük miktarlarda triptofan ve metiyonin; en az düzeyde ise sistein amino asidlerini içerdiği bulunmuştur. Enzimin p-hidroksimerküri benzoat tarafından inaktivasyona sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle enzimin aktif merkezinde esansiyel olarak sisteinin SH grubunun varlığı düşünülmektedir. Yapılan diğer deneysel çalışmalar katalitik kısımda sistein ve histidin varlığını göstermektedir (28,73,92). Enzimin pH 8,0'de k_m değeri 0.1×10^{-6} M ve optimum pH'ı 8.0-8.5 olarak bulunmuştur (62).

Mansoor ve ark. (66); 1963 yılında maymundaki, Norstrand et al (88) 1965 yılında insanda guanazın beyin farklı bölgelerinde farklı düzeylerde olduğunu göstermişlerdir. Bu farklılık 50 katna kadar ulaşabilir. Bu derecede varyasyonlar genellikle sadece nöromedyatörlerin veya ikincil habercilerin metabolizmasıyla ilişkili enzimlerde gözlenmiştir. Bu durum guanin deaminazın da aynı zamanda böyle bir fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Fare beyninin farklı bölgelerinde guanaz aktivitesi 50 kattan fazla değişiklik gösterir. Beyin korteksi ve amigdalede en yüksek aktivite görülür. Oysa fare ve kedinin serebellumunda hemen hemen aktivite yoktur (4,16). Fare beyninin hemen hemen 100 farklı bölgesinde guanaz ölçüldüğünde enzim düzeyleri telensefalunun tüm kısımlarında, hem gri ve hem de beyaz maddede nispeten daha yüksektir. Enzim özellikle olfaktuar tüberkül ve amigdalede aktiftir. Diensefalondaki düzeyleri telensefalondan düşük veya yüksektir. Kaudal'den diensefalona kadar ki beyin bölgeleri ve serebellumun tüm kısımlarında saptanabilecek düzeyde guanaz aktivitesi bulunamamıştır. Guanaz düzeyinin dokuda geniş dağılım aralığı göstermesi bir nöroefektörün metabolizmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir (4).

Hem farede hem de sıçanda cGMP fosfodiesteraz düzeyi serebellum, pons, medulla ve spinal kordda beyin diğer bölgelerine göre çok daha düşüktür (15). Bu durum guanaz aktivitesinin dağılımı ile oldukça paralellik göstermektedir. Guanin nükleotidleri ve nükleozidlerinin katabolizması ile ilişkili bu iki enzimin dağılımının yakın korelasyon göstermesi nedeniyle bunlar MSS'de cGMP düzeylerinin regülasyonu ile ilişkili olabilir (27,84).

Guanin deaminaz beyinde amonyak oluşumuna katkıda bulunur (81). Guanaz aktivitesi insan merkez sinir sisteminin gliyal elementlerinde ve nöronlarda histokimyasal yöntemlerle saptanmıştır (87). İnsan beyninde doğumdan itibaren var olan guanaz aktivitesi yaklaşık 4 ayda erişkin düzeyine ulaşır (56). Sıçanlarda ise beyin dokusunda guanaz aktivitesi doğumdan itibaren 4. haftaya kadar kademeli olarak artış göstermektedir (85). Sıçanın postnatal gelişiminde beyinde 40 günde guanaz aktivitesi 10 kattan daha fazla ekspresyon artışı gösterir (6).

Sıçan nöronal kültürlerinde 14.güne kadar süren olgunlaşma döneminde AMP-deaminaz ve guanaz aktivitesinde artış görülmüştür. Sıçan beyninde ise in vivoda

hamileliğin 18. gününden doğumdan sonraki 14. güne kadar olgunlaşma, AMP-deaminaz ve guanaz aktivitesindeki artışla ilişkili bulunmuştur. Beyinde amonyak oluşturan bu iki enzimde olgunlaşmanın neden olduğu artışın fizyolojik önemi henüz bilinmemektedir (6).

Sıçan astroglia kültür hücrelerinde yaşlanmanın pürin yıkılımlında fonksiyon yapan AMP deaminaz , pürin nükleozid fosforilaz ve guanaz enzimlerinin aktivitelere anlamlı bir artışla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (126).

Dokuya spesifik ve gelişmeye bağlı görülen ekspresyon değişiklikleri o enzimin guanin nükleotid havuzunun regülasyonundaki potansiyel bir rolünü düşündürür. Hüresel GTP sadece spesifik enzim reaksiyonlarında ve protein sentezinde değil aynı zamanda sinyal ileti yollarında da önemli bir role sahiptir (123).

II.4. Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.)

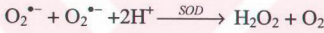
Aerob hücrelerin tümünün, serbest radikallerin oluşumunu en az düzeye indirecek ya da alternatif olarak serbest radikaller oluşur oluşmaz bunları hızla parçalayacak koruyucu mekanizmalar geliştirdiklerini biliyoruz (18).

Serbest radikaller vücutta normal olarak antioksidan enzimleri (süperoksid dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz), antioksidan küçük molekülleri (E vitamini, C vitamini, karotenler, flavanoidler, glutatyon, ürik asit ve taurin) ve selenyum, çinko gibi eser elementleri kapsayan etkili sistemlerle nötrale edilirler. Sağlıklı bireylerde serbest radikaller ve antioksidanlar arasında hassas bir denge vardır (19,99). Bunların fizyolojik düzeylerinden küçük sapmalar lipidler, proteinler ve DNA'ya oksidan hasara karşı hücrelerin direnci üzerine dramatik bir etki yapabilir (74).

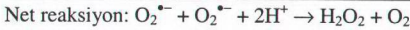
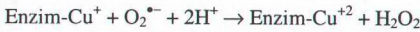
SOD'ın keşfi antioksidan savunma sistemleri hakkında bugünkü bilgilerimize temel oluşturmuştur. Bu durum oksijen toksisitesi için süperoksid teorisinin ileri sürülmesine yol açmıştır (23).

İlk olarak 1969 yılında McCord ve Fridovich eritrosit proteininin süperoksid radikalini katalitik olarak uzaklaştırabildiğini ve bu proteinin süperoksid dismutaz olarak görev yaptığını gösterdiler. SOD iki molekül süperoksid radikalini ($O_2^{\bullet-}$) dismute ederek hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturur (61,117). SOD sadece süperoksid'in katalitik olarak ortamdaki uzaklaştırılmasına özgüdür (23).

Süperoksid radikali oluşuktan hemen sonra spontan olarak dismutasyona uğrayarak H_2O_2 oluşturur bu reaksiyon SOD etkisiyle oldukça hızlı bir şekilde meydana gelmektedir (32). Süperoksid radikalinin dismutasyonu reaksiyonunda denge ürün oluşumu yönündedir (53).

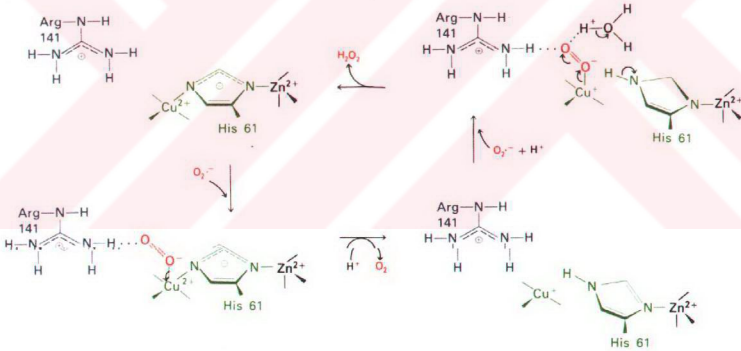


Süperoksid radikali moleküler oksijen ve hidrojen peroksit göre stabil değildir (24). Sulu ortamda kendiliğinden ve oldukça hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak oksijen molekülü ve hidrojen peroksit oluşturur (96). $O_2^{\bullet-}$ 'nin katalizsiz dismutasyonu için genel hız sabiti çözeltinin pH'ına oldukça bağlıdır ve fizyolojik pH'da yaklaşık $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'dir. Bovin eritrosit Cu, Zn SOD'ın katalizlediği reaksiyon 5.3-9.5 aralığında pH'dan hemen hemen bağımsızdır ve $O_2^{\bullet-}$ 'in aktif kısım reaksiyonu için hız sabiti yaklaşık $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'dir (23).



Zn^{+2} katalitik siklusda fonksiyon görmez fakat enzimi stabilize etmeye yardım eder. Genel olarak Mn^{+2} gibi diğer geçiş metallere iyonları fonksiyonel enzim oluşturmak üzere bakırın yerinin alamaz fakat kobalt, civa veya kadmiyum iyonları Zn^{+2} 'nin yerini alarak enzim stabilitesini artırabilir (23). Bakır esas olarak katalitik çinko ise yapısal bir rol oynar (24).

Negatif yüklü süperoksit çok pozitif yüklü katalitik kısma elektrostatik bağlarla bağlanır. Süperoksit radikali Cu^{+2} 'ye ve arginin kalıntısının guanido grubuna bağlanır. Süperoksitten bir elektron bakır iyonuna transfer olarak Cu^{+1} ve moleküler oksijen oluşturur. Oksijen molekül ortama salınır. İkinci bir süperoksit aktif kısma girer ve Cu^{+1} , arginin ve H_3O^+ ya bağlanır. Bağlı süperoksit Cu^{+} dan bir elektron ve bağlandığı kısımlardan iki proton alarak H_2O_2 oluşturur ve enzimin Cu^{+2} li şekli rejenere olur (106).



Şkil 3. SOD'ın etki mekanizması (106).

Süperoksit dismutazlar oksijen toksisitesine karşı hücrel savunmada önemli olan ilk komponentlerdir. Çünkü $O_2^{\bullet-}$, dismutate edilemezse H_2O_2 ile reaksiyona girerek daha reaktif ve sitotoksik olan singlet oksijen ve hidroksil radikallerini oluşturur (40).

SOD enziminin aerob hücrelerin tümünde bulunduğu fakat anaerobların çoğunda bulunmadığı bilinmektedir (76,98). Çünkü enzimin fizyolojik fonksiyonu aerob metabolizma reaksiyonları yoluyla oluşan süperoksit radikallerinin hasar yapıcı potansiyel etkilerine karşı hücreyi korumaktır (58,94). Fridovich ve arkadaşları (21) SOD enziminin aerob hücrelerin yaşamı için gerekli olduğunu gösteren daha ileri kanıtlar bulmuşlardır.

Bugüne kadar SOD enziminin dört farklı izozimi bulunmuştur (21). Bunlardan biri ökaryotların hücre sitozolünde ve membranlar arası boşlukta bulunan bakır ve çinko içeren SOD enzimi (Cu, Zn SOD)'dir (89). Mn içeren iki tür SOD enzimi vardır. Bunlardan biri mitokondri matriksinde bulunur ve diğeri E.coli ve Streptococcus mutans gibi bakterilerin matriksinde bulunur (44,114,115) Fe SOD ise aerob bakterilerin çoğunda bulunur (109). Fe SOD ve Mn SOD'nin amino asit dizilişleri benzerdir. Fakat Cu, Zn SOD'unkinden oldukça farklıdır (3). Mn SOD enzimi daha çok mitokondri matriksinde bulunur (75). Ekstrasellüler sıvılarda Cu, Zn SOD'un farklı bir formu bulunur ve EC-SOD olarak adlandırılmıştır (68,70). EC-SOD bakır ve çinko içeren bir enzimdir. EC-SOD sekretuar bir glikoproteindir ve ekstrasellüler sıvıların ana SOD izozimidir (1).

Ökaryotlarda bulunan Cu, Zn SOD'un molekül ağırlığı 32 bin Dalton olup iki alt birimden ibarettir (71). Her bir alt birim bir bakır ve bir çinko iyonu içeren aktif bir kısım taşır (23). İnsanda Cu, Zn SOD enzimini kodlayan gen 21q21.1 numaralı kromozomda bulunur (75).

Cu, Zn SOD enzimi siyanür tarafından inhibe olmaktadır. Doku ekstratlarındaki Cu, Zn SOD enziminin aktivitesi, 5mM siyanür tarafından spesifik olarak inhibe edilebilmektedir (122).

SOD enziminin bütün izozimlerinde enzimin aktif merkezindeki metalin kelat yapıcı ajanlar kullanılarak uzaklaştırılması katalitik aktivitenin kaybına yol açmakta, metalin tekrar sağlanmasıyla aktivite yeniden kazanılmaktadır (22).

SOD son derece stabil bir enzimdir. İzolasyon işlemi sırasında enzim, hemoglobinin denatüre olduğu koşullarda kloroform ve etanolle muamele edildiğinde bozulmamaktadır. İzolasyon işleminin diğer safhasında, dipotasyum fosfat ilave edilerek alkolden zengin faz çözünür. Enzim aktivitesi organik fazda bulunur, bu aktivite asetonla presipitasyon işleminden sonra yeniden kazanılmaktadır. Bu enzimin olağanüstü bir çözünürlük özelliği olduğunu göstermektedir (46).

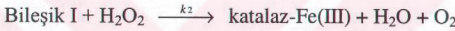
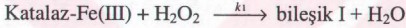
II.5. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

CAT bilinen en eski enzimlerdendir. 1901 yılında Loew tarafından bu ad verilmiştir (101). Enzim, $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalizler. H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu ile oluşur. Birkaç bakteri dışında aerobik hücrelerin çoğunda katalaz bulunur. Katalaz hayvanlarda organların çoğunda özellikle de eritrositlerde ve karaciğerde bol bulunur. Katalaz, eritrositlerde hemoglobinin otooksidasyonu sonrasında meydana gelen $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 'e karşı hücreyi korumada yardımcı olabilir. Eritrositler kolaylıkla difüzyona uğrayan H_2O_2 'yi absorbe ederek diğer dokuları da oksidatif hasara karşı koruyabilirler (118).

Hücre alt fraksiyonları düzeyinde katalaz peroksizomlarda %80 oranında, sitozolde ise yaklaşık %20 oranında bulunur. Dokuların katalaz aktivitesi fazlasıyla değişkendir. Beyin, kalp ve iskelet kası karaciğere göre daha düşük düzeylerde katalaz içerir. Katalaz aktivitesi karaciğer ve böbrekte yüksek iken, bağ dokusunda düşüktür. En yüksek aktivite eritrositlerde olup, serumdan 3600 kat fazladır. Dokularda çoğunlukla mitokondri ve peroksizomlarda kısmen bağlı olarak bulunur. Serum katalaz aktivitesi ile eritropoez arasında bir korelasyon vardır. Bu korelasyon hemolizden etkilenir (26,69,108,119).

Katalaz dört protein alt biriminden ibarettir. Herbir alt birim aktif merkezine bağlı bir ferrik hem grubu içerir. Hem grupları nonpolar cepler içerisinde saklı olup molekül yüzeyine dar kanallarla bağlanırlar böylece H_2O_2 'den daha büyük moleküllerin geçişini önlerler. Enzim depolandığında, dondurulup çözüldüğünde veya asid ya da alkaliye maruz bırakıldığında alt ünitelerine ayrılır, bu da aktivite kaybına neden olur (104). İnhibitörler: azid, siyanür, 3-amino-1,2,4-triazol, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve ditiyotreitoldür (108).

Katalazın reaksiyon mekanizması SOD 'a benzer bir şekilde esas olarak bir dismutasyondur. Bir H_2O_2 , H_2O 'ya indirgenirken diğeri O_2 'ne oksidlenir.



Sıçan karaciğer katalazı için k_1 ve k_2 hız sabitleri sırasıyla $1.7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ ve $2.6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 'dir. Bileşik I, H_2O_2 'den iki elektron alarak tekrar ferrik katalazı oluşturur.

Katalazı H_2O_2 ile doyumak oldukça zordur. Enzimin H_2O_2 'in yıkımı için V_{max} değeri oldukça yüksektir. Ancak H_2O_2 'nin tam olarak uzaklaştırılması için iki molekül H_2O_2 'in katalaz enziminin tek bir aktif kısmı ile etkileşmesi gerekmektedir. Bu, H_2O_2 konsantrasyonu düştükçe azalır. Katalaz ve H_2O_2 karışımında bileşik I'in miktarı bunların konsantrasyonlarına ve k_1 ile k_2 hız sabitlerine bağlıdır (13).

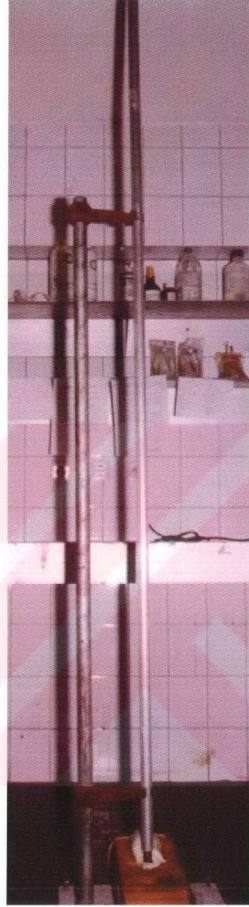
Kono ve Fridovich (50) süperoksid radikallerinin katalazı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. H_2O_2 nin katalazı inhibe ettiği uzun zamandan beri bilinmektedir. H_2O_2 tarafından katalazın inaktivasyonunu NADPH' nin önlediği gösterilmiştir (110). İndirgenmiş glutatyonun (GSH) katalazı dozaja bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (108). İnsanda katalazı kodlayan gen 11p 13 numaralı kromozomda bulunur (76).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

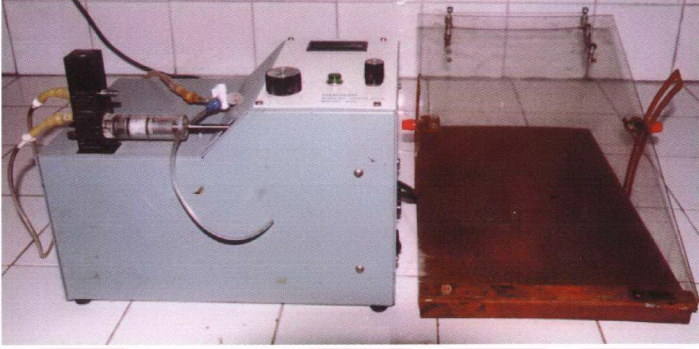
Bu çalışmada İ.Ü. C.T.F. Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarından temin ettiğimiz Spraque-Dawley soyu erişkin erkek sıçanlar seçildi. Yaygın kafa travması oluşturmak için Marmarou'nun impakt-akselerasyon modeli kullanıldı (72). Sıçanlar, oluşturulan travmanın şiddetine bağlı olarak iki gruba ayrıldı. I. Gruba 1m yükseklikten, II. Gruba 2m yükseklikten 450 gr ağırlık düşürüldü. III. Grup kontrol grubu olarak kullanıldı. Başlangıçta sıçanların ağırlıkları ölçülerek kaydedildi (ortalama gram ağırlık: 261.32 ± 31.42 gram). Sıçanlara 30mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak tiopental verildi. Genel anestezi altında sıçanlar endotrakeal yol ile entübe edilip orta hattan kafa derisi insüzyonu yapıldıktan sonra koronal ve lambdoid sütürlerin arasındaki orta kısma 1cm çapındaki çelik disk sıkıca yapıştırıldı. Travma aletinde ağırlığın düşürüleceği yükseklik ayarlandıktan sonra sıçan yüzükoyun pozisyonunda köpük yatağın üzerine koyuldu. Sıçanın yatış pozisyonu; kafatasına yerleştirilen çelik disk, ağırlığın içinde ilerleyeceği pleksiglas tüpün alt ucuna gelecek şekilde ayarlandı. 450g ağırlık istenilen yükseklikten serbestçe bırakılarak pleksiglas tüp boyunca ilerleyip diskin üzerine düşürüldükten hemen sonra sıçan aletin altından alınarak operasyon masasında birkaç dakika izlendikten ve kafatası fraktürü yönünden incelendikten sonra solunum cihazına bağlandı. Sıçanlardan travma sonrası 30. ve 60. dakikalarda kuyruk ucu kesme tekniğiyle heparinli eppendorf tüplerine kan alındı. Kan örnekleri +4°C'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri -86°C'de çalışma gününe kadar saklandı. Travmadan sonra 60. dakikada kan örnekleri alındıktan sonra sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları ayrıldı. Sıçan beyinleri serum fizyolojikle iyice yıkandıktan sonra enzim analizinin yapılacağı zamana kadar -86°C'de muhafaza edildi. Beynin sol yarım küresi alınarak teflon uçlu homojenizatör kullanılarak +4°C'de 0.05 M (pH=7.4) fosfat tamponu içerisinde homojenize edilerek %20'lik doku homojenatı hazırlandı. MSE model sonikatör kullanılarak soğukta, 15 saniye ara ile üç defa sonikasyon yapıldı. Biofuge A. Rotation Heraeus Christ eppendorf santrifüjünde 20000 rpm'de 10 dakikada santrifüj edildi. Süpernatant -86°C'de çalışma gününe kadar saklandı.



Şkil 4. Kafa travma aleti



Şkil 5. Spraque-Dawley soyu erişkin erkek sıçana kafa travmasının uygulanması



Şkil 6. Sıçan ventilatör cihazı

III. 1. Kullanılan Aletler ve Cam Malzemeler

- Schimadzu Libror AEU-210 hassas terazi.
- Rua Instruments -86 °C derin dondurucu.
- Biofuge A. Rotation Heraeus Christ eppendorf santrifüjü.
- MSE homojenizatör.
- MSE sonikasyon cihazı.
- Sıçan ventilatörü cihazı.
- Schimadzu uv/vıs 1201 spektrofotometre.
- Boehringer Mannheim 4010 fotometre.
- Elektro-mag vorteks.
- Schott CG 840 pH metre.
- Eppendorf ve socorex otomatik pipetler.
- Denev tüpleri, cam pipetler, erlen-mayer, balon joje, cam kapsül, vb. cam eşyalar.

III. 2. Kimyasal Maddeler

Guanaz için:

Guanin, ksantin oksidaz (SİGMA), katalaz (BOEHRİNGER), süperoksit dismutaz, Triton X-100, potasyum siyanür (KCN), potasyum fosfat (KH_2PO_4 ve K_2HPO_4), nitroblue tetrazolium (NBT), sodyum hidroksit.

SOD için:

Ksantin, nitroblue tetrazolium, ksantin oksidaz (XO), bakır klorür ve bovin serum albumin (SİGMA); disodyum EDTA, sodyum karbonat (MERCK).

Protein için:

Sodyum karbonat, sodyum hidroksit, bakır sülfat, sodyum wolframat, hidroklorik asit, lityum sülfat, brom (MERCK); sodyum-potasyum tartarat (HOPKİN WILLİAMS); sodyum molibdat (RIEDEL); ortofosforik asit (KARLO ERBA); Albumin (SİGMA).

Katalaz için:

Fosfat tamponu (pH 7.0), hidrojen peroksit (MERCK).

III.3. Kimyasal Çözeltiler

Guanaz için:

Çözelti I (R₁)

150 U Süperoksit Dismutaz

1300 kU Katalaz

4 U Ksantin Oksidaz

0.1mol/L potasyum fosfat tamponu (pH:8.3)

Çözelti II (R₂)

KCN

Nitroblue tetrazolium (NBT)

150 mL/L Triton X-100

6 mmol/L guanin

40 mmol/L NaOH

SOD için:

0.3 mM/L Ksantin

0.6 mM/L EDTA

150 µM/L EDTA

150 µM/L Nitroblue tetrazolium (NBT)

400 mM/L Na₂CO₃

1g/L Bovin Serum Albümin (BSA)

0.167 U/mL Ksantin oksidaz

8 mM/L CuCl₂

Katalaz için:

pH 7.0 Fosfat tamponu

38 mmol/L H₂O₂

III.4. Yöntemler:

Guanaz tayini:

Guanaz aktivitesinin tayin yönteminin esası ksantin/ksantin oksidaz sisteminde guanaz etkisiyle oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu mor renkli formazana indirgemesi prensibine dayanır (86).

Çözelti I 'i (R₁)hazırlamak için 100 mL'lik bir beherde;

4 µL SOD

100 µL CAT

50 µL XO

5846 µL 0,1 mol/L KH₂PO₄ tamponu (pH=8.3) içinde çözülür.

Çözelti II' i (R₂) hazırlamak için 100 mL'lik bir beherde;

2.5 mg KCN

5 mg NTB

2.5 mL Triton X-100 çözeltisi

2.5 mL guanin çözeltisi (40 mM/L NaOH içerisinde) karıştırılır ve distile su ile 10 mL 'ye getirilir.

Plazmada;

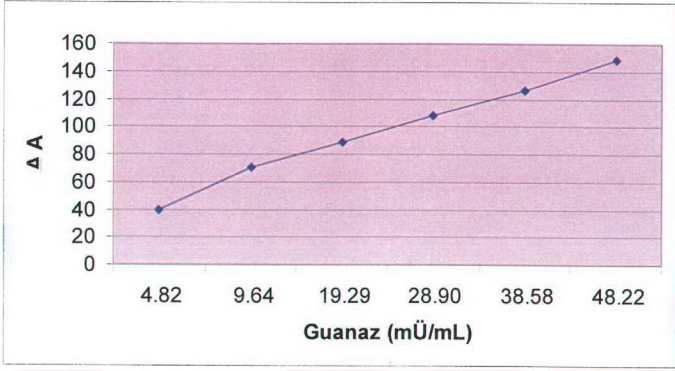
	Test (mL)
Plazma	0.05
R ₁	0.25
3.4 dakika 37°C'de inkübe edilir.	
R ₂	0.16

Reaksiyon başladıktan sonra 5.6 ve 8. dakikalardaki formazan oluşumuna bağlı absorbandsadaki artış ölçülür.

Dokuda;

	Test (mL)
Doku (%20'lik homojenat)	0.02
R ₁	0.25
R ₂	0.16

Reaksiyon başladıktan sonra 5.6 ve 8. dakikalardaki formazan oluşumuna bağlı absorbandsadaki artış ölçülür.



Şkil 7. Guanaz Standart Grafiđi

SOD tayini:

SOD aktivitesinin tayin yönteminin esası ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksid anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır (107).

Reaksiyon karışımı için 200 mL'lik bir behere;

40 mL Ksantin

20 mL EDTA

20 mL Nitroblue tetrazolium

12 mL Na₂CO₃

6 mL Bovin serum albumin konulur ve pH=10.2'ye ayarlanır.

Plazmada;

	Test (mL)
Plazma	0.02
Distile su	0.18
Kloroform-Etanol	0.16

10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.

	Blank (mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	1	1
Distile su	0.16	-
Supernatant	-	0.16
Ksantin Oksidaz	0.1	0.1

25°C'de 20 dakika inkube edilir.

CuCl ₂	0.05	0.05
-------------------	------	------

Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda formazan oluşumu ölçülür.

Dokuda;

	Blank(mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	1	1
Distile su	0.02	-
Doku(%20'lik homojenat)	-	0.02
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

25°C'de 20 dakika inkube edilir.

CuCl ₂	0.05	0.05
-------------------	------	------

Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda formazan oluşumu ölçülür.

$$\text{Hesabı: \% İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{test}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Plazma ve dokuda SOD aktivitesi Sun yöntemi modifiye edilerek ölçüldü (107).
1 Ünite SOD aktivitesi, nitroblue tetrazoliumun indirgenme hızını %50 inhibe eden protein miktarı olarak tanımlanır.

Protein tayini:

Beyin dokusu protein düzeylerinin belirlenmesinde Folin-Lowry yönteminden yararlanıldı. Yöntemin esası, folin ayracının proteinlerin peptid bağları ve tirozin, triptofan gibi aromatik halkalı amino asitler ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan mavi renkli ürünün absorbansının spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda okunmasına dayanmaktadır(64).

	Blank (mL)	Standart (mL)	Test (mL)
Doku (%20'lik homojenat)	-	-	0.01
Distile su	0.01	-	-
Protein Standardı	-	0.01	-
Alkali Tartarat Çalışma Çözeltisi	0.5	0.5	0.5

Oda ısısında 15 dakika inkübe edilir.

1/2 oranında distile su ile dilüe edilmiş Folin-Ciocalteu Fenol çözeltisi

0.05 0.05 0.05

Kuvvetlice karıştırılır.

Oda ısısında 30 dakika inkübe edilir.

Spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda blank'e karşı standart ve test tüplerinin absorbansları okunur. Oluşan renk birkaç saat stabildir.

$$\text{Hesap: \%mg protein} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{standart}}} \times 100$$

Katalaz tavini:

Katalaz aktivitesinin tayininde modifiye Aebi yöntemi kullanıldı (120). Bu yöntemde reaksiyon hızı, 240 nm'de H₂O₂'nin absorbsındaki azalma izlenerek belirlenir.

Plazmada;

	Test (mL)
Plazma	0.005
Fosfat tamponu (pH:7)	0.395
H ₂ O ₂	0.2

Reaksiyonun başladığı an 0. dk olarak kabul edilir. Absorbans ölçülür. 30 ° C'de 5 dk inkübe edilir ve son absorbans ölçülür.

Dokuda;

	Test (mL)
Doku (%20'lik homojenat)	0.005
Fosfat tamponu (pH:7)	0.395
H ₂ O ₂	0.2

Hesap: Aktivite (kU/L) = $\Delta A/dk \times (600/5) \times 1/0.04$

III. 5. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi:

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirilmesi Anova testi, Dunnett t testi, HSD Tukey testi ve Pearson Regresyon Korelasyon Analizi ile yapıldı.

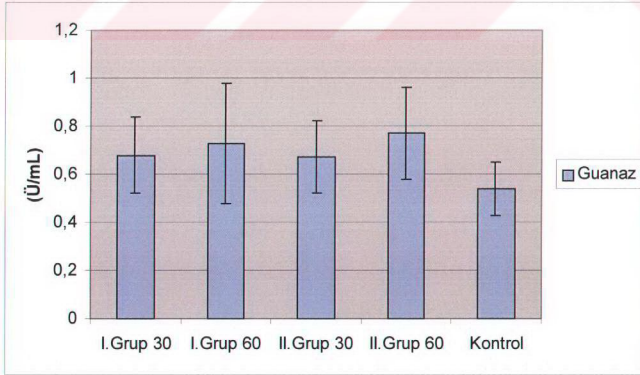
IV. BULGULAR

1m (Grup I) ve 2m (Grup II) yükseklikten ağırlık düşürmek suretiyle oluşturulan yaygın beyin hasarı sonrası elde edilen bulgular istatistiksel olarak Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde plazma guanaz aktivitesinde sadece travma sonrası 60. dakikada tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.05$). Dunnett t testi uygulandığında travma sonrası 60. dakikada plazma guanaz aktivitesi II. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.04$).

Tablo 1. Plazma Guanaz değerleri.

Grup	N	Guanaz (Ü/mL)
I ₃₀	8	0.68±0.16
I ₆₀	8	0.73±0.25
II ₃₀	8	0.67±0.15
II ₆₀	8	0.77±0.19
Kontrol	8	0.54±0.11

II₆₀ – Kontrol: $p=0.04$



Şkil 8: Plazma Guanaz değerleri.

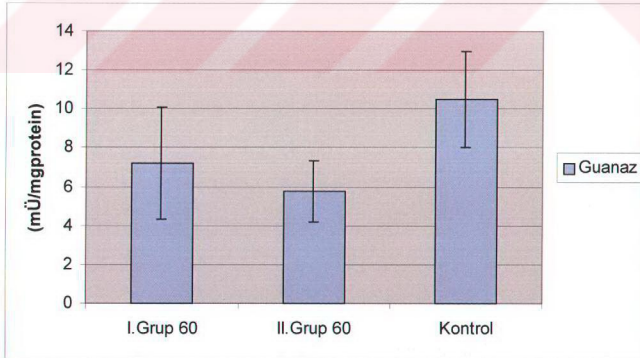
Travma sonrası 60. dakikada sıçanlar dekapite edilerek alınan beyin dokularında guanaz aktivitesi Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde, tüm gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.002$). Dunnett t testi uygulandığında beyin dokusu guanaz aktivitesi hem I. Grupta ($p=0.02$) hem de II. Grupta ($p=0.001$) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. Fakat Tukey HSD testine göre travma uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 2. Doku Guanaz değerleri.

Grup	N	Guanaz (mÜ/mg protein)
I ₆₀	8	7.20±2.89
II ₆₀	8	5.79±1.58
Kontrol	8	10.50±2.46

I₆₀ – Kontrol: $p= 0.02$

II₆₀ – Kontrol: $p= 0.001$



Şkil 9. Doku Guanaz değerleri.

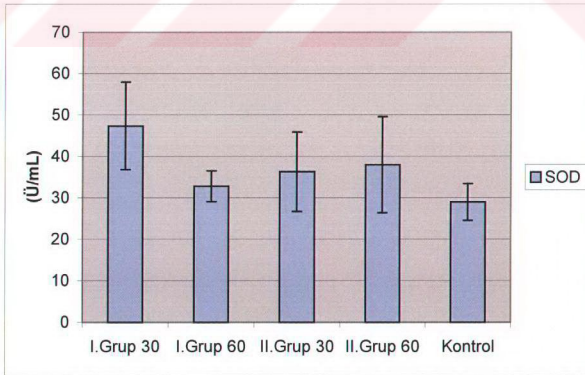
Anova tek yönlü varyans analizi yapıldığında, plazma SOD aktivitesinde sadece travma sonrası 30. dakikada tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.001$). Dunnett t testi uygulandığında; plazma SOD aktivitesinde travma sonrası 30. dakikada I. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ($p=0.001$), travma sonrası 60. dakikada ise II. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görüldü ($p=0.047$). Tukey HSD testi yapıldığında plazma SOD aktivitesinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 3. Plazma SOD değerleri.

Grup	N	SOD (Ü/mL)
I ₃₀	8	47.37±10.53
I ₆₀	8	32.78±3.69
II ₃₀	8	36.27±9.56
II ₆₀	8	37.96±11.58
Kontrol	8	28.98±4.47

I₃₀-Kontrol: $p= 0.001$

II₆₀-Kontrol: $p=0.047$

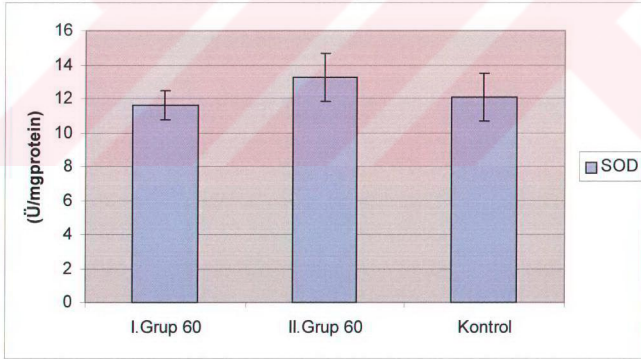


Şekil 10. Plazma SOD değerleri.

Travmatik beyin dokusunun SOD aktivitesi istatistiksel olarak Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görüldü ($p=0.045$). Dunnett t testi uygulandığında; travma oluşturulan gruplarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Tukey HSD testi yapıldığında I. Grup ile II. Grup arasında anlamlı bir fark görüldü ($p=0.042$).

Tablo 4. Doku SOD değerleri

Grup	N	SOD (Ü/mg protein)
I ₆₀	8	11,63±0,85
II ₆₀	8	13,27±1,42
Kontrol	8	12,10±1,41



Şkil 11. Doku SOD değerleri

Anova tek yönlü varyans analizi yapıldığında; travma sonrası 30. (p=0.001) ve 60. (p=0.012) dakikalarda plazma CAT aktivitesinde tüm gruplar arasında anlamlı farklar saptandı. Dunnett t testi uygulandığında; travma sonrası 30. dakikada plazma CAT aktivitesinde hem I. Grup (p=0.000) hem de II. Grupta (p=0.028) kontrol grubuna göre anlamlı artışlar görüldü. Travma sonrası 60. dakikada da hem I. Grup (p=0.045) hem de II. Grupta (p=0.009) kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptandı. Tukey HSD testi yapıldığında travma uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 5. Plazma CAT değerleri.

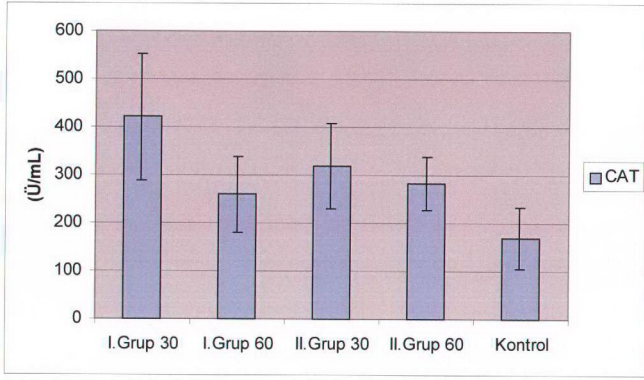
Grup	N	CAT (kÜ/L)
I ₃₀	8	421.86±131.82
I ₆₀	8	260.17±78.44
II ₃₀	8	319.67±89.94
II ₆₀	8	284.29±55.98
Kontrol	8	169.86±63.35

I₃₀ – Kontrol: p=0.000

II₃₀ – Kontrol: p=0.028

I₆₀ – Kontrol: p=0.045

II₆₀ – Kontrol: p=0.009

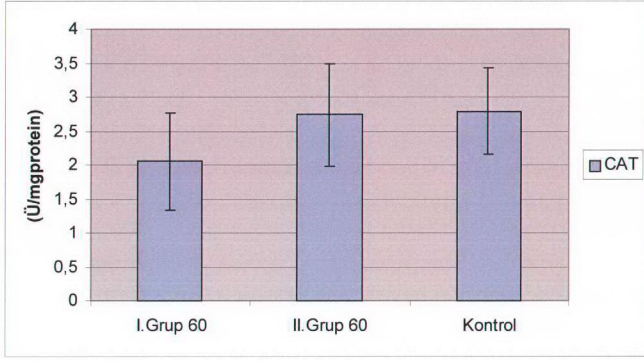


Şkil 12. Plazma CAT değerleri.

Travmatik beyin dokusunda CAT aktivitesi istatistiksel olarak Anova tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. I. ve II. Grubun doku CAT aktivitesi Dunnett t testi uygulanarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Tukey HSD testi ile de travma uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 6. Doku CAT değerleri.

Grup	n	CAT (Ü/mg protein)
I ₆₀	8	2.05±0.71
II ₆₀	8	2.74±0.76
Kontrol	8	2.79±0.64



Şkil 13. Doku CAT değerleri.

Tüm gruplar için istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanan parametreler için regresyon korelasyon analizi yapıldığında travma sonrası 30. ve 60. dakika plazma guanaz değerleri arasında zayıf, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı saptandı ($p=0.05$). Travma sonrası 30. ve 60. dakika plazma CAT değerleri arasında orta güçte, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı bulundu ($p=0.05$). Travma sonrası 60. dakika plazma guanaz ve CAT değerleri arasında zayıf, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı saptandı ($p=0.05$). Travma sonrası 60. dakika plazma ve doku guanaz değerleri arasında zayıf, ters yönde ve geçerli bir bağıntı bulundu ($p=0.05$). Travma sonrası 60. dakika doku SOD ve CAT değerleri arasında zayıf, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı saptandı ($p=0.05$).

Kontrol grubunda 30. ve 60. dakikalardaki plazma CAT ($pCAT_{30}$ ve $pCAT_{60}$) değerleri arasında tam, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı saptandı ($p=0.01$). Bunun dışında 30. ve 60. dakikalardaki plazma guanaz ($pGUA_{30}$ ve $pGUA_{60}$) değerleri arasında da tam, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı bulundu ($p=0.01$). Ayrıca beyin dokusunda 60.dakika SOD ($dSOD_{60}$) ve CAT ($dCAT_{60}$) değerleri arasında çok güçlü, aynı yönde ve geçerli bir bağıntı saptandı ($p=0.01$) (Tablo 7).

Tablo 7. Kontrol Grubunun Pearson Korelasyon Analizi.

Kontrol	pCAT₆₀	pGUA₆₀	DCAT₆₀
pCAT₃₀	$r=1.0000$ $p= 0.01$		
PGUA₃₀		$r= 1.0000$ $p= 0.01$	
DSOD₆₀			$r=0.9469$ $p=0.01$

I. Grupta çalışılan parametreler arasında geçerli bir bağıntı olmadığı bulundu.

II. Grupta travma sonrası 30. dakikada plazma SOD ve CAT değerleri arasında çok güçlü, ters yönde ve geçerli bir bağıntı bulundu. ($r:-0.8914$ ve $p:0.05$).

V. TARTIŞMA

Kafa travmasını takiben oluşan hücre hasarının çoğu primer mekanik etkiyle başlayan bir seri nörokimyasal ve patofizyolojik olaylar zinciriyle meydana gelir (32). Kafa travmasında çeşitli biyokimyasal parametrelerin analizleri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Deneysel modellerin çoğu soğuk hasar veya sıvı perküzyonu gibi çeşitli teknikler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Marmarou'nun impakt-akselerasyon modeli kullanılarak sıçanlarda fraktür oluşmadan yaygın beyin hasarı meydana getirildi. Bu amaçla 1m ve 2m yükseklikten ağırlık düşürme tekniğiyle oluşturulan kafa travmasında, travmayı takiben 30. ve 60. dakikalarda alınan kan örneklerinde ve 60. dakikada dekapitasyonla alınan beyin dokusunda guanaz, SOD, CAT aktiviteleri tayin edildi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre travma sonrası 30. dakikada her iki grupta da kontrol grubuna göre plazma guanaz aktivitesinde anlamlı olmayan artışlar saptadık. Travma sonrası 60. dakikada ise plazma guanaz aktivitesini II. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulduk. Buna karşılık travmatik beyin dokusunda her iki grupta da guanaz aktivitesinde kontrol grubuna göre travma şiddetiyle orantılı olmayan anlamlı azalma bulduk. Plazma ve beyin dokusu guanaz aktiviteleri arasında korelasyon saptanmadı.

Nöronların normal fonksiyonu için pürin nükleotid metabolizması hayati öneme sahiptir. Pürin metabolizmasındaki bazı kalıtsal bozukluklar nörolojik anormalliklerle ilişkilidir (6). Pürin nükleotidlerinin biyosentezi, birbirine dönüşümü ve yıkımında birçok enzim görev alır. Bu enzimlerin tam olarak fonksiyonu bilinmemekle beraber pürin metabolizmasındaki işlevlerinden başka bir takım önemli roller oynadıkları düşünülmektedir (82). Guanaz, pürin metabolizmasının önemli anahtar enzimlerinden biridir.

ATP ve GTP gibi pürin nükleotidlerinin hücre içindeki rolleri iyi bilinmektedir. Adenin ve guanin ile metabolik ürünleri olan ksantin ve hipoksantin ekstrasellüler boşluğa salınarak hücreler arası sinyal molekülleri olarak görev yaparlar. Sinir sisteminde hem nörotransmisyon gibi aracı etkileri hem de hücre metabolizması, yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikleri indükleyen trofik etkileri vardır. Bu yüzden uzun süreli etkilidirler (93). Fare beyinde 100 farklı bölgede yapılan guanaz enzimi aktivitesi ölçümüne dayanılarak bu enzimin nöroeffektör metabolizmasında rol oynayabileceği öne sürülmektedir (4).

İskemi veya travma sonrası ekstrasellüler ortama bol miktarda pürin, kısmen guanozin ve daha az miktarda adenozin salınır. Travmayı takiben in vivo ortamda pürinler trofik etkiler gösterirler. Guanozinin fokal beyin hasarından sonra ekstrasellüler ortamda bir hafta boyunca yüksek konsantrasyonlarda kalması nedeniyle in vivo'da önemli bir trofik etkisinin olabilmesi söz konusudur (93).

Guanazın dokuya spesifik ve gelişmeye bağımlı görülen ekspresyonundaki değişiklikler bu enzimin nükleotid havuzunun regülasyonunda potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Hücresel GTP'nin sadece spesifik enzim reaksiyonlarında ve protein sentezinde değil aynı zamanda sinyal ileti yollarında da önemli role sahiptir (123). Bu nedenle doku guanaz aktivitesinde travmada görülen değişikliklerin bu gibi birçok hücresel fonksiyonu önemli derecede etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Travma sonrası nöronal dejenerasyonda, oksijen radikalleri aracılı lipid peroksidasyonunun önemli bir faktör olduğu görüşü gittikçe ağırlık kazanmaktadır (30,33,34,77,83).

Astrositlerde bazı antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının yüksek olması bu hücrelerin oligodentrositler ve nöronlara göre oksidatif strese karşı daha dirençli olmalarını sağlar. Antioksidan mekanizmalar yetersiz kaldığında eşik fenomen oluşur. Oksidatif stres SOR oluşum ve eliminasyon arasındaki dengesizliktir (116).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda kafa travması sonrası MSS'nin fonksiyonel durumu ile beyin metabolizması arasındaki ilişki incelendiğinde travma sonrasında beyin tüm bölgelerinde lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, antioksidan aktivitede ise belirgin bir azalma olduğu görülmüştür (91). Hafif ve ağır kafa travmasında, akut dönemde lipid peroksidasyonu daha ön plandadır. Antioksidan sistem aktivitesindeki azalma, lipid peroksidasyon ürünlerinin neden olduğu beyin hasarının artmasına yol açar (110,111). Shohami ve arkadaşları (101) daha da ileri giderek reaktif oksijen türevlerinin beyin hasarının patofizyolojisinde anahtar rolü oynadığını ve bu türevlerin endojen ve eksojen antioksidanlar tarafından nütrolizasyonunun klinik açıdan iyileşmede etkili olduğunu ifade etmektedirler.

Kapalı kafa travması modelinde travmadan 1 ve 24 saat sonra beyin, kalp, akciğer, böbrek, ince barsak, karaciğer ve cilt dokularında total düşük molekül ağırlıklı antioksidanların toplam düzeylerinde dinamik değişiklikler oluşu kapalı kafa travmasına tüm vücudun yanıt verdiğini göstermektedir. Örneğin; kalp, böbrek, akciğer ve karaciğerde 1 saat sonra görülen DMAA (düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar)'da geçici azalma onların muhtemelen lokal olarak oluşan SOR ile etkileşimi sonucu tüketildiğini düşündürmektedir. Buna göre bu çalışmada hasar sadece sol hemisferde oluşturulmasına rağmen beyin hasarını takiben 24 saat içerisinde tüm vücudun oksidatif stres altında olduğu görülmektedir (102).

İnsanda kafa travmasının akut fazında prooksidan ve antioksidan dengesi incelendiğinde, travma hasarının derecesi ne kadar yüksek ise lipid peroksidasyon sürecinin o kadar artmış olduğu ve vücut antioksidan sistem fonksiyonunda da o derece azalma olduğu görülmüştür (111). Ağır kafa travmasının lipid peroksidasyon süreçlerini şiddetlendirdiği, antioksidan sistem aktivitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum lipid peroksidasyon süreçlerinin yan ürünleri tarafından travmalı beyin daha ileri hasarına neden olur. Hasarı takiben 12. ve 24. aylarda dahi

antioksidan aktivitede azalma olduğu bildirilmiştir (110). Deneysel ve klinik MSS travmasının ve iskeminin tedavisinde antioksidanların ve serbest radikal temizleyicilerinin kullanımı, bu patofizyolojik durumlar ile lipid peroksidasyonu ve oksijen radikalleri arasındaki ilişkiyi desteleyen kanıtlar sağlamıştır (5). Beyin hasarından 30 dakika sonra beyin yüzeyine SOD ve CAT uygulandığında beyin hasarını takiben oluşan serebral arteriollerin anormal reaktivitesi ve sürekli dilatasyonu geri dönüşmüştür. Buna göre oksijen radikalleri temizleyicileri ile tedavi beyin hasarının etkilerinin bir kısmının inhibisyonunu ve geri dönüşümlü olmasını sağlayabilir (51).

Lipozoma tutturulmuş Cu Zn-SOD soğğun indüklediği vazojenik ödem gelişimini ve kan beyin engelinin bozulmasını önleyici etkiler göstermektedir. Lipozoma tutturulmuş Cu Zn-SOD'un travma öncesi uygulanması ile fokal serebral iskemisi sonrası ödem ve infarkt düzeylerinde azalma görülmüştür. SOD'nin beyin hasarı üzerine koruyucu etkisi insan Cu Zn-SOD enziminin aşırı ekspresyonunu yapan transjenik farelerle yapılan ileri çalışmalarla kanıtlanmıştır. Dışarıdan farmakolojik ajanların uygulanması ile veya genetik manipulasyonlarla serebral SOD düzeylerinin artırılması travma ve fokal serebral iskeminin indüklediği beyin ödemi ve infarktını düzeltmektedir (7,124).

Travmatik beyin hasarı sonrası salınan aşırı miktardaki $O_2^{\bullet-}$ 'yi temizleyebilmek için ekstrasellüler boşlukta sadece az miktarda SOD enzimi bulunmaktadır. Ağırlık düşürme tekniğiyle serebral kontüzyon oluşturulan modelde eksojen lesitine bağlanmış SOD verilmesiyle kontüzyondan altı saat sonra lezyonun periferinde beyin ödemi azalmıştır. Kontüzyondan otuz dakika sonra periferik bölgede SOD aktivitesi artmış ve bu artış 6. saate kadar devam etmiş sonra normal düzeye dönmüştür. Bulgular travma sonrası beyin ödemi gelişiminde $O_2^{\bullet-}$ 'nin önemli rolünün olduğunu ve eksojen SOD verilmesinin $O_2^{\bullet-}$ 'ye karşı koruyucu etki göstererek beyin ödemi azalttığını göstermektedir (10,124). Reperfüzyona bağlı beyin hasarını önlemek amacıyla sentetik SOD uygulandığında; enzimin pH'sı azalmış dokularda biriktiği, ayrıca vasküler permeabiliteyi düzelttiği ve nörolojik bulguları iyileştirdiği gösterilmiştir. Buna göre $O_2^{\bullet-}$ ve/veya metabolitleri reperfüzyon hasarı patogeneğinde kritik rol oynayabilir (113).

Tavşan beyinde kranioserebral travmadan bir gün sonra beyin tüm bölgelerinde konjugedienler, TBA-reaktif ürünler ve floresan Schiff bazlarında artış, antioksidan aktivitede ise büyük bir azalma saptanmıştır (91). Michelson ve arkadaşları (80) tarafından kafa travması yapılan sıçanlarda beyin Cu Zn-SOD aktivitesinde hafif bir azalma, lipid peroksidasyonunda ise artış bulunmuştur.

Soğuk hasar oluşturulan sıçanlarda gri madde ayrıldıktan sonra hasarlı kısmın korteksinin merkezinde, periferinde ve lezyon olmayan kısmın distalinde Cu Zn-SOD'nin mRNA ekspresyonu anlamlı derecede azalmış bulunmuştur. Bunun olası nedeni soğuk hasar ile ilişkili aşırı derecede düşük ısı olabilir (25).

Tavşanlarda orta derecede kafa hasarı oluşturulduğunda travmadan 15 dakika sonra katalaz aktivitesinde 3 kat azalma beyin SOD aktivitesinde ise travmadan 7 ve 14 gün sonra sadece %38 azalma bulunmuştur (67). Shohami ve arkadaşları (103) ise ağırlık düşürme yöntemiyle sıçanlarda sol serebral hemisferde oluşturulan kafa travmasından sonra 15. dakikada ve 4. ile 24. saatlerde alınan kortikal doku örneklerinde SOD aktivitesi ölçüldüğünde hasar kısmında, kontrolateral bölgede ve her iki hemisferin uzak frontal loblarında bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir.

Primer ve tekrarlayan beyin hasarının beyin ve kanda prooksidan ve antioksidan süreçlerin değişimi üzerine etkisi albino sıçanlarda otuz gün boyunca incelendiğinde tekrarlayan beyin hasarında primer beyin hasarına göre lipid peroksidasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kandaki ve beyin dokusundaki lipid peroksidasyon değişiklikleri arasında ise korelasyon bulunmamıştır (32).

Elde ettiğimiz bulgulara göre, guanaz aktivitesine benzer şekilde SOD ve CAT aktivitelerinde de genel olarak kontrol grubuna göre travma sonrası plazmada artış, dokuda ise azalmalar saptadık. Plazma SOD aktivitesinde travma sonrası 30. dakikada I. Grupta, 60. dakikada ise II. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı artışlar görüldü.

Plazma CAT aktivitesinde ise travma sonrası 30. ve 60. dakikalarda her iki grupta da kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptadık. Doku CAT aktivitesinde travmada görülen azalma travmanın daha şiddetli olduğu II. grupta kontrol grubu değerlerine oldukça yakın bulunmuştur. Doku SOD aktivitesinde ise diğerlerinden farklı olarak sadece II.grupta kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da bir artış saptadık.Guanaz enziminde olduğu gibi SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde de plazma ve doku değerleri arasında korelasyon bulunmamaktadır. Genel olarak plazma SOD ve CAT aktivitelerinde başlangıçta artışın daha fazla olmasının nedeni dokudan ekstrasellüler ortama hızlı bir geçişi düşündürmektedir. Buna karşılık ilerleyen dakikalarda bu geçiş daha da azalmaktadır. II. grupta doku SOD ve CAT aktivitelerinde görülen yükselme eğilimleri zaman içerisinde travmaya bağlı olarak artış gösteren serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirebilmek için organizmanın antioksidan savunma sistemini tetiklemesine bağlı olabilir.

Sonuç olarak ölçtüğümüz üç parametreden sadece plazma CAT aktivitesi travma sonrası her iki grupta da kontrole göre belirgin artış göstermektedir. Enzimlerin doku ve plazma düzeyleri arasında korelasyon bulunmamakta ve travma sonrası enzim aktivite düzeylerinde çeşitli farklılıklar görülmektedir. Uygulanan bu yaygın beyin hasarı modelinin sonuçlarına göre travmatik beyin hasarında zamana ve travma şiddetine bağımlı plazma ve doku enzim aktiviteleri arasındaki olası ilişkiyi değerlendirmek için bu konuda çeşitli zaman aralıklarında ileri çalışmalar yapmanın daha yararlı olabileceği kanısındayız.

VI. ÖZET

Kafa travması, sakatlık ve mortalitenin en önemli nedenlerinden birini oluşturur. Travma sonrası hasar primer ve sekonder mekanizmalar aracılığıyla oluşur. Mekanik faktörler primer hasara neden olurlar. Primer hasarın etkilerini sekonder hasarlar artırır. Sekonder hasar prosesi bazı mekanizmaların birbirleriyle karmaşık bir etkileşimini kapsamaktadır. Bu çalışmada yaygın beyin hasarında Guanaz, SOD ve CAT enzimlerinin plazma ve beyin dokusu aktivitelerini zamana ve travma şiddetine bağlı olarak değerlendirmeyi amaçladık. Bunun için Marmarou'nun impakt-akselerasyon modeli kullanılarak erişkin erkek sıçanlar üç gruba ayrılarak 1m ve 2m yükseklikten ağırlık düşürülmek suretiyle oluşturulan yaygın beyin hasarında Guanaz, Süperoksid Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) aktiviteleri sırasıyla Nishikawa, Sun ve Yasmineh yöntemleriyle tayin edildi. Elde ettiğimiz bulgulara göre Guanaz, SOD ve CAT aktivitelerinde genel olarak travma sonrası kontrol grubuna göre plazmada artış, dokuda ise azalmalar saptadık. Bu parametrelerden sadece plazma CAT aktivitesi travma sonrası her iki grupta da kontrole göre belirgin artış göstermektedir. Enzimlerin doku ve plazma düzeyleri arasında korelasyon bulunmamakta ve travma sonrası enzim aktivite düzeylerinde çeşitli farklılıklar görülmektedir. Uygulanan bu yaygın beyin hasarı modelinin sonuçlarına göre travmatik beyin hasarında zamana ve travma şiddetine bağımlı olası ilişkiyi değerlendirmek için bu konuda çeşitli zaman aralıklarında ileri çalışmalar yapmanın daha yararlı olabileceği kanısındayız

SUMMARY

Trauma to the brain or spinal cord is an important cause of mortality and disability. After central nervous system (CNS) injury, neural damage occurs through both primary and secondary mechanisms. Secondary injury can magnify the effects of the original injury. The secondary injury process involves a complex interplay of mechanisms. In this study we aimed to evaluate time and severity dependent of guanase, superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities in plasma and brain tissue in diffuse brain injury. For this purpose we used impact acceleration method of Marmarou in which adult rats were separated into three groups and a diffuse brain injury were made by dropping a weight from 1 and 2m height, respectively. Guanase, SOD and CAT activities were determined by the methods of Nishikawa, Sun and Yasmineh, respectively. According to our results we established that after trauma guanase, SOD and CAT activities were generally increased in plasma and decreased in tissue when compared to control group. Only plasma CAT activity indicated an obvious increase in both groups compared to control group. There is no correlation between tissue and plasma levels of enzymes and after trauma various differences are seen in the levels of enzyme activities. According to the results of this applied diffuse brain injury model, we propose to make a further investigation in various time intervals on this subject may be more useful in order to evaluate a possible time and severity dependent relationship between plasma and tissue enzyme activities in traumatic brain injury.

VIII. KAYNAKLAR

1. Adachi T, Nakamura M, Yamata H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. *Clin Chim Acta* 1994; 229: 123-131.
2. Agardh CD, Zhang H, Smith ML, Siesjo BK. Free radical production and ischemic brain damage: influence of postischemic oxygen tension. *Int J Dev Neurosci* 1991; 9: 127-138.
3. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G: Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987; 22: 111-180.
4. Berger SJ, Carter JG, Lowry OH. Distribution of guanine deaminase in mouse brain. *J Neurochem* 1985; 44:1736-1740.
5. Braugher JM, Hall ED. Involment of lipid peroxidation in CNS injury. *J neurotrauma* 1992; 9: 1-7.
6. Brosh S, Sperling O, Bromberg Y, Sidi Y. Developmental changes in the activity of enzymes of purine metabolism in rat neuronel cells in culture and in whole brain. *Journal of neurochemistry* 1990; 54: 1776-1781.
7. Chan P. Antioxidant dependent amelioration of brain injury: role of CuZn-superoxide dismutase.
8. Chan PH, Fishman RA. Brain edema: induction in cortical slices by slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* 1978; 201: 358-360.
9. Chan PH, Fishman RA. Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* 1980; 35: 1004-1007.
10. Chan PH, Longar S, Fishman RA. Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema. *Ann Neurol* 1987; 21: 540-547.
11. Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 1984; 34: 315-320.
12. Chan PH, Yurko M, Fishman RA. Phospholipid degradation and cellular edema induced by free radicals in brain cortical slices. *J Neurochem* 1982; 38: 525-531.

13. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
14. Currie R, Bergel F, Bray RC. Enzymes and cancer. Preparation and some properties of guanase from rabbit liver. *Biochem J* 1967; 104: 634-638.
15. Davies LP, Taylor KM. Rat brain guanine deaminase; correlation with regional levels of cyclic GMP phosphodiesterase. *J Neurochem* 1979; 13: 951-952.
16. Dawson DM. Absence of guanine deaminase from cerebellum. *Neurology* 1971; 21: 621-626.
17. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993; 49: 577-587. 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; 10:1007-1019.
18. Feeney L, Berman ER. Oxygen toxicity. Membrane damage by free radicals. *Invest Ophthal* 1976; 15: 789-792.
19. Florence TM. The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol* 1995; 23: 3-7.
20. Fogle PJ, Bieber AL. Purification of rabbit liver guanina aminohydrolase. *Prep Biochem* 1975; 5: 59-77.
21. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 1974; 41: 35-97.
22. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 1986; 58:61-97.
23. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
24. Fridovich I. The biology of oxygen radicals: The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 1978; 201: 875-880.
25. Fukuhara T, Ono Y, Kawauchi M, Asari S, Ohmoto T. Expression of Cu, Zn-superoxide dismutase mRNA after cold and contusion injury in the rat brain. *Neurosci Lett* 1995; 193: 133-136.
26. Goth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hung Sci Instrum* 1982; 53: 43-46.

27. Greenberg LH, Troyer E, Ferendelli JA, Weiss B. Enzymatic regulation of the concentration of cyclic GMP in mouse brain. *Neuropharmacology* 1978; 17: 737-745.
28. Gupta NK, Glantz MD. Isolation and characterization of human liver guanine deaminase. *Arch Biochem Biophys* 1985; 236:266-276.
29. Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA. Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 1993; 60: 588-594.
30. Hall ED, Braughler JM, McCall JM. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 165-172.
31. Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1993; 71: 81-105.
32. Hall ED, Traystman RJ. Secondary tissue damage after CNS injury. In: Hall ED, Traystman RJ (eds). *Current Concepts*. The Upjohn Company, Michigan, 1993; 4-28,
33. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 425-442.
34. Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 1022-1027.
35. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992; 76: 13-22.
36. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxidative stress and disorders of the nervous system: general principles. In: Halliwell B, Gutteridge JM (eds). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed. University Press, Oxford, 1999; 721-731.
37. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623.
38. Hindman HB, Knox WE. Guanase in reticulocytes and other rat tissues. *Enzyme* 1978; 23:395-403.
39. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11.

40. Ishikawa M. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993; 45: 842-848.
41. Ito S, Tsuji Y, Iwasaki A, Kitagawa N, Tamura Y, Fujii S. Relationship Between guanase activity in donor blood and the incidence of posttransfusional non-A, non-B hepatitis, and a possible method for preventing posttransfusional hepatitis. *Hepatology* 1986; 6:990-993.
42. İnci S, Ozcan OE, Kilinc K. Time-level relationship for lipid peroxidation and the protective effect of alpha-tocopherol in experimental mild and severe brain injury. *Neurosurgery* 1998; 43: 330-335.
43. Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med* 1998; 21: 309-334.
44. Keele BB, Mc Cord JM, Fridovich I. Superoide dismutase from *Escherichia Coli* B.: A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem* 1972; 245: 6176-6181.
45. Kihara T, Sakata S, Ikeda M. Direct detection of ascorbyl radical in experimental brain injury: microdialysis and an electron spin resonance spectroscopic study. *J Neurochem* 1985; 65: 282-286.
46. King E, Mason HS, Morrison M. Oxidase and related redox system. Baltimore, University Park Press 1973, 51.
47. Kirkman HN, Galiona S, Gaetani GF. The function of catalase bound NADPH. *J Biol Chem* 1987; 262: 660-666.
48. Kistler JP, Ropper AA, Martin JB. Cerebrovascular disease. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (eds). *Principles of Internal Medicine*. 12.ed. McGraw-Hill Inc, New York, 1991; 1977-2002
49. Knights EM, Whitehouse JL, Hue AC, Santos CL. Serum guanase determination: A liver-function test. *J lab Clin Med* 1965; 65:355-360.
50. Kono K, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1985; 57:508-516.
51. Kontos HA, Povlishock JT. Oxygen radicals in brain injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 1986; 3: 257-263.

52. Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg* 1986; 64: 803-807.
53. Koppenthal WH, Butter J. Mechanisms of reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *FEBS Lett* 1977; 83:1-6.
54. Kossman T, Lenzlinger PM, Stover JF, Stocker R, Morganti-Kossmann MC, Trentz O. Neurochemical changes and current pharmacological approaches in craniocerebral trauma. *Unfallchirurg* 1997; 100: 613-622.
55. Kumar S, Ou SW, Rathi M, Hospital C. Deficiency of guanine deaminase in human brain: A new brain disorder? *The New England Journal of Medicine* 1979; 300:1332-1333.
56. Kumar S, Rathi M. Deficiency of a naturally occurring protein inhibitor in brain of clinically 'brain damaged' newborn human infants: a possible cause of mental retardation? *Neurosci Lett* 1976; 3:163-165.
57. Kumar S, Tewari KK, Krishnan PS. Guanine-deaminase activity in rat brain and liver. *Biochem J* 1965; 95: 797-802.
58. Kuthan H, Haussman HJ, Werringloer J. A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. *Biochem* 1986; 237: 175-180.
59. Kuwashima J, Fujitani B, Nakamura K, Kadodawa T, Yoshida K, Shimizu M. Biochemical changes in unilateral brain injury in the rat: a possible role of free fatty acid accumulation. *Brain Res* 1976; 110: 547-557.
60. Kuzmits R, Seyfried H, Wolf A, Müller M M. Evaluation of serum guanase in hepatic diseases. *Enzyme* 1980; 25: 148-152.
61. Lavelle F, Michelson AM, Dimitrijevic L. Biological protection by superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 55: 350-357.
62. Levin R, Hall TC, Harris CA. Guanase activity in normal and neoplastic human tissue. *Cancer* 1963; 16: 269-272.
63. Lonrot K, Metsa-Ketela T, Molnar G, Ahonen JP, Latvala M, Peltola J, Pietila T, Alho H. The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 211-217.
64. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AC, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-266.

65. Mandel E, Macalincag LR. Evaluation of serum guanase in clinical diagnosis. *Am J Gastroenterol* 1970; 54: 253-266.
66. Mansoor M, Kalyonkar GD, Talwar GP. Brain guanine deaminase: purification, properties and regional distribution. *Biochem Biophys Acta* 1963; 77: 307-317.
67. Marchenkov FS, Vasileva IG, Vasilev AN. The superoxide dismutase activity of the brain and liver tissues in a rabbit with an experimental brain conclusion. *Vrach Delo* 1991; 12: 66-68.
68. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 1982; 126:41-51.
69. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982; 42: 1955-1961.
70. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984; 74: 1398-1403.
71. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7634-7638.
72. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: morphological characterization. *J Neurosurg* 1994; 80: 301-313.
73. Martinez-Farnos L, Gubert S, Bozal J. Liver and brain guinea-pig guanine aminohydrolase. *Rev Esp Fisiol* 1978; 34:205-212.
74. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999; 4: 339-349.
75. Mc Alpine PJ, Boucheix C, Pakstis AJ, Stranc LC, Bernt TG, Shows TB. The 1988 catalog of mapped genes and report of the nomenclature committee. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 49:4-38.
76. Mc Cord JM, Keele BB, Fridovich I. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis. The physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1971; 68: 1024-1027.
77. McKinney JS, Willoughby KA, Liang S, Ellis EF. Stretch-induced injury of cultured neuronal, glial, and endothelial cells. Effect of polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase. *Stroke* 1996; 27: 934-940.

78. Mcleod S. Evaluation of serum guanase as a liver function test. *Can J Med Technol* 1967; 29: 60-68.
79. Mendelow AD, Teasdale GM. Pathophysiology of head injuries. *Br J Surg* 1983; 70: 641-650,
80. Michelson AM, Jadot G, Puget K. Treatment of brain trauma with liposomal superoxide dismutase. *Free Radic Res Commun* 1988; 4: 209-224.
81. Miyamoto S, Ogawa H, Shiraki H, Nakagawa H. Guanine deaminase from rat brain. Purification, Characteristics, and contribution to ammoniogenesis in the brain. *J Biochem* 1982; 91:167-176.
82. Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Enzymes involved in purin metabolism- a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1321-1340.
83. Muir JK, Tynan M, Caldwell R, Ellis EF. Superoxide dismutase improves posttraumatic cortical blood flow in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12: 179-188.
84. Nakazawa K, Sano M. Studies on guanylate cyclase. A new assay method for guanylate cyclase and properties of the cyclase from brain. *J Biol Chem* 1974; 249: 4207-4211.
85. Nardiello S, Galanti B, Russo M, Guarino F. Postnatal behavior of guanase activity in rat tissues. *Enzyme* 1978; 23: 353-355.
86. Nishikawa Y, Fukumoto Koichi, Fukuko Watanabe. Simple rapid determination of serum guanase activity with the Hitachi 736 automated discrete analyzer. *Clin Chem* 1985; 31: 103-105.
87. Norstrand I, Libbin R, Druck P, Enker S. The histochemical demonstration of guanase: observations in the human central nervous system. *Acta Histochem* 1979; 64: 187-193.
88. Norstrand IF, Glantz MD, Sass M. Comparative activity of guanase in various levels of the central nervous system and in the spinal fluid of man, in *Proceedings of the fifth International Congress of Neuropathology. Excerpta Medica International Congress Series IVO* 1965; 963-965.
89. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer. A review. *Cancer Res* 1979; 39:1141-1149.

90. Percer ME. Catalase: an old enzyme with a new role. A review. *Can J Biochem Cell Biol* 1984; 62: 1006-1014.
91. Promyslov MS, Demchuk ML. Interrelationship between the functional state of the central nervous system and lipid peroxidation level in brain following craniocerebral trauma. *Mol Chem Neuropathol* 1995; 25: 69-80.
92. Pugh ME, Bieber AL. Studies of rabbit brain, intestine and liver guanine aminohydrolase. *Comp Biochem Physiol* 1984; 77: 619-627.
93. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iario P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 663-690.
94. Rister M, Baehner RL. A comparative study of superoxide dismutase activity in polymorphonuclear leukocytes, monocytes and alveolar macrophages of the Guinea pig. *J Cell Physiol* 1976; 87: 345-355.
95. Ropper AH. Trauma of the head and spinal cord. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (eds). *Principles of Internal Medicine*. 12.ed. McGraw-Hill Inc, New York, 1991; 2002-2010
96. Rotilio G, Calabrese L, Agro AF, Argento-Ceru MP, Autori F, Mondovi B. Intracellular localization of superoxide dismutase and its relation to the distribution and mechanism of hydrogen peroxide-producing enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1973; 321: 98-102.
97. Saik LA, Hsieh HL, Baricos WH, Shapira E. Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *Pediatr Res* 1982; 16: 933-937.
98. Saltzman HA, Fridovich I. Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme. Superoxide dismutase. *Circulation* 1973; 48: 921-923.
99. Sardesai VM. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract* 1995; 10: 19-25.
100. Scholar EM, Calabresi P. Identification of the enzymatic pathways of nucleotide metabolism in human lymphocytes and leukemia cells. *Cancer Res* 1973; 33: 94-103.

101. 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; 10: 1007-1019.
102. Shohami E, Gati I, Beit-Yannai E, Trembovler V, Kohen R. Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile. *J Neurotrauma* 1999; 16: 365-376.
103. Shohami E, Shapira Y, Rosenthal J, Reches A. Superoxide dismutase activity is not affected by closed head injury in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1991; 2: 103-109.
104. Sichak SP, Dounce AL. A study of the catalase monomer produced by lyophilization. *Biochim Biophys Acta* 1987; 925: 282-289.
105. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med* 1988; 16: 954-963.
106. Strayer L. *Biochemistry*. 3ed. WH. Freeman and Company, New York, 1988; 422-423.
107. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
108. Sun Y, Oberley LW. The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radical Biology & Medicine* 1989; 7: 595-602.
109. Sun Y. Free Radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. Review Article. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 583-599.
110. Sutkovi DA, Pedachenko EG, Malyshev OB, Guk AP, Troian AI, Morozov AN, Glushchenko NV, Fedosenko TN. The activity of free radical lipid peroxidative reactions in the acute and late periods of severe craniocerebral trauma. *Lik Sprava* 1999; 2: 57-59.
111. Sutkovi DA, Smaliukh IuV. Correction of lipid peroxidation disorders of patients in the acute period after craniocerebral trauma. *Klin Khir* 1992; 12: 19-21.
112. Thorogood MC, Armstead WM. Influence of polyethylene glycol superoxide dismutase/catalase on altered opioid-induced pial artery dilation after brain injury. *Anesthesiology* 1996; 84: 614-625.

113. Tkeda Y, Hashimoto H, Kosoka F, Hirawa M, Inoue M. Albumin-binding superoxide dismutase with a prolonged half-life reduces reperfusion injury. *Am J Physiol* 1993; 264:1708-1715.
114. Vance PG, Keele BB, Rajayopalan KV. Superoxide dismutase from streptococcus mutans. *J Biol Chem* 1972; 247: 4782-4786.
115. Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase organella specificity. *J Biol Chem* 1971; 248: 3582-3591.
116. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1149-1163.
117. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrel RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337-341.
118. Winterbourn CC, Stern A. Human red cells scavenge extracellular H₂O₂ and inhibit formation of HOCL and OH[•]. *J Clin Invest* 1987; 80: 1486-1491.
119. Yamagata S, Seino S. Studies on blood and plasma catalase. *Tohoku J Exp Med* 1953; 57:231-238.
120. Yasmineh WG, Kaur TP, Blazar BR, Theologides A. Serum Catalase as Marker of Graft-vs-Host Disease in Allogenic Bone Marrow Transplant Recipients: Pilot Study. *Clin Chem* 1995; 41: 1574-1580.
121. Yoko N, Fukumoto K. Kinetic measurement of guanine deaminase in serum with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1981; 27: 560-561.
122. Ysebeart VM, Vanneste WH. Qualitative resolution of Cu, Zn-and Mn-superoxide dismutase activities. *Anal Biochem* 1980; 107: 86-95.
123. Yuan G, Bib JC, McKay DJ, Snyder FF. Cloning and characterization of human guanine deaminase. *J Biol Chem* 1999; 274: 8175-8180.
124. Yunoki M, Kawauchi M, Ukita N, Noguchi Y, Nishio S, Ono Y, Asari S, Ohmoto T, Asanuma M, Ogawa N. Effects of lecithinized superoxide dismutase on traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1997; 14: 739-746.
125. Zaleska M, Floyd RA. Regional lipid peroxidation in rat in vitro: possible role of endogenous iron. *Neurochem Res* 1985; 10: 397-410.

126. Zoref-Shani E, Bromberg Y, Lilling G, Gozes I, Brosh S, Sidi Y, Sperling O. Developmental changes in purine nucleotide metabolism in cultured rat astroglia. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 887-896.



IX. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İstanbul'da doğdum. Sırasıyla 1982 yılında Özel Şişli Terakki Lisesinin ilkokul bölümünden, 1989 yılında Beyoğlu Anadolu Lisesinden mezun oldum. 1995 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'ni bitirdim. 24.10.1997 yılında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık öğrencisi olarak göreve başladım.

