

71
T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMADA
MELATONİNİN ANTIOKSİDAN ENZİMLER
ÜZERİNE ETKİSİ

DR. BÜLENT BİLİCİLER

UZMANLIK TEZİ

MALATYA
1997

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Genel Kütüphane

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMADA
MELATONİNİN ANTIOKSİDAN ENZİMLER
ÜZERİNE ETKİSİ

DR. BÜLENT BİLİCİLER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YARD. DOÇ. DR. AYHAN KOÇAK

T.C. İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ



02516101

tu RC 1997.B55
Biliciler, Bülent
ant Deneysel subaraknoid kanamada melatoninir

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Nöroşirürji Anabilim dalında UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Onay:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, desteğini içtenlikle ve titizlikle sürdürerek, çalışmalarımnda çok büyük yardım ve ilgilerini gördüğüm danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Ayhan Koçak' a;

Tüm Beyin Cerrahisi ihtisasım süresince hoşgörülerini, sabırları ve bilgileri ile bana çok büyük destek veren Nöroşirürji ABD Başkanımız Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ'a, Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK'a ve Sayın Doç. Dr. Aytaç AKBAŞAK'a;

Çalışmamın deneysel aşamalarının gerçekleşmesinde çok büyük yardımlarını gördüğüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Bülbin Sunar AKBAŞAK' a, Fen Fakültesi doktora programı öğrencileri Sayın Songül KANDEMİR' e ve Sayın İlknur ÖZDEMİR'e, Farmokoloji ABD öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU'na;

Tüm çalışmalarım boyunca desteklerini gördüğüm Nöroşirürji ABD Araştırma görevlisi arkadaşlarım Sayın Dr. Mustafa Safi VATANSEVER, Sayın Dr. Serhat Fuat ERTEN ve Sayın Dr. Ayhan TEKİNER' e;

Son olarak çalışmalarım boyunca bana sabırla katlanan ve manevi desteğini gördüğüm eşim Hatice BİLİCİLER' e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR	V
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
I- SAK	4
II- SEREBRAL İSKEMİ	7
A) İskemik Strok Sendromu	7
B) Anterior ve Posterior İskemi	10
III- VAZOSPAZM	11
A) Tanım ve Tarihçe	11
B) Sınıflandırma ve insidansı	11
C) Vazospazm Teorileri	13
D) Vazospazm ile İlgili Tedavi ve Görüşler	15
IV- SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	18
A) Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türevleri	19
B) Serbest Oksi-radikaller	21
C) Serbest Radikallerin Hücreyel Kaynakları	24
D) Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri Toksik Etkileri	28
E) Serbest Radikallere Karşı Hücreyel Savunma Sistemleri	30
F) Hücre İçi Antioksidatif Savunmayı Sağlayan Enzimler	32
G) Santral Sinir Sistemi Patolojilerinde ROT'lerinin Rolü	35
V- MELATONİN	41
1) Melatoninin Sekresyonu	42
2) Melatoninin Metabolizması	42
3) Melatoninin etkileri	43
MATERYAL VE METOD	45
I- MATERYAL	45
II- METOD	45
A) DENEY GRUPLARI	45
B) SAK OLUŞTURULMASI	46
C) MELATONİN UYGULANMASI	46
D) HOMOJENİZASYON VE SANTI FÜJ İŞLEMİ	48
E) PROTEİN TAYİN YÖNTEMİ	48
F) ENZİM AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ	49
G) İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	54
BULGULAR	55
TARTIŞMA	62
SONUÇ	73
ÖZET	75
KAYNAKLAR	76
EKLER	97

KISALTMALAR

c-AMP	Siklik Adenozin 3'-5' Monofosfat
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	Katalaz
CT	Bilgisayarlı Beyin Tomografisi
EDRF	Endotel-Derived Relaxing Factor
ET	Endotelin
GAG	Glukoz Amino Glikan
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSH-R	Glutasyon Redüktaz
GSSG	Okside Glutasyon
NAT	N-Asetil Triptamin
MAO	Monoamin Oksidaz
MDA	Malondialdehid
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
PRIND	Prolonged Reversible Ischemic Neurological Deficid
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SAK	Subaraknoid Kanama
SKA	Serebral Kan Akımı
SOD	Süperokside Dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikali
SSS	Santral Sinir Sistemi
VSP	Vazospazm
TBA	Tiyobarbitürik Asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin parankim dokusu dışında primer olarak subaraknoid mesafeye olan kanamalar Subaraknoid Kanama (SAK) olarak isimlendirilir. Subaraknoid kanamaların görünüm sıklığı, değişik serilerde farklılık olmakla birlikte 6-19,4/100.000 bir yıl olarak bildirilmektedir(1-3). Subaraknoid kanamaların en sık oluşma nedeni, anevrizma rüptürüdür. Buna da olguların yaklaşık yarısında rastlanır. Bir başka deyişle Anevrizma rüptürüne bağlı SAK insidansı her yıl için 1/10.000'dir(4). Ülkemizde epidemiyolojik bir çalışma yapılmamış olmakla birlikte diğer ülkelerdeki insidans gözönüne alındığında, Türkiye'de her yıl yaklaşık 7000 kişi anevrizmal SAK nedeni ile tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Bunun dışında kafa travmaları, cerrahi girişimler, intrakranial arteriovenöz malformasyonlar, hipertansiyon ve kan diskrazileri gibi patolojilerde SAK'a neden olurlar. Klinik ve radyolojik çalışmalarda spontan SAK'ların yaklaşık %20'sinde bilinen bir neden saptanamamaktadır(5). Bunun ötesinde SAK'ın yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması, bu patolojinin önemini daha da artırmaktadır(6,7).

SAK sonrası erken dönemde, yaşamını sürdüren hastaların yaklaşık yarısında takip eden günlerde artan nörolojik defisit görülür. Bu bu tablo SAK sonrası gelişen serebral iskemiye bağlıdır. İskeminin oluşumunda vazospazm en önemli nedendir ve olguların yaklaşık % 40'ında görülür. SAK ve sonrasında gelişen bu tip komplikasyonlar son 50 yıl içinde giderek artan bir ilgi ile izlenmiş; özellikle son 25 yıl içinde SAK sonrası oluşan vasküler değişiklikler detaylı olarak araştırılmıştır(8-13). Ancak serebral vazospazmın etyolojisini saptamaya yönelik bu araştırmalar, beraberlerinde farklı hatta zaman zaman birbirine zıt tedavi seçeneklerini gündeme getirmiştir. Vazospazmın oluş mekanizmasını açıklamak için bugüne kadar bir çok hipotez öne sürülmüştür. Bugün ulaşılan nokta vazospazm etyolojisi ve tedavisini kesin olarak açıklamaktan uzaktır ve bilinen odur ki SAK ve sonrası gelişen vazospazm birbirini takibeden

multifaktöriyel patolojik bir süreçtir. Invivo ve/veya invitro çalışmalarda, vazospazmın patogeneğinde kan elemanlarından salınan amin, protein, peptid, lipid veya organik iyon yapısında birçok maddenin spazmojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca perivasküler ve nöronal savunma mekanizmalarının bu olayda varlığı incelenmiş ve bu mekanizmalarla oluşan serebrovasküler reaktivite ile iskemi kliniğini oluşturan geç vazospazm arasında zaman ve potansiyel etkinlik yönünden uygun korelasyon olup olmadığı tartışılmıştır.

Serbest radikaller, son 15 yıl içinde üzerinde en fazla tartışılan mekanizmalardan biri olup gerek SAK, gerekse serebrovasküler olay, travma ve neoplazi gibi santral sinir sistemini (SSS) ilgilendiren bir çok patolojide rol oynadığı gösterilmiştir. İnsan vücudunda diğer bir çok organ gibi santral sinir sistemi içinde bazı serbest radikallerin normal biyolojik süreç içinde bazı düzeyde yapım ve yıkımı aralıksız olarak süregelmekte, ancak patolojik durumlarda bu sitotoksik maddelerin yapımının kontrolsüz olarak arttığı ve hücre ölümüne yol açtığı görülmektedir. SAK'ı takibeden pıhtı lizisi sonucu açığa çıkan oksihemoglobinin methemoglobine oto-oksidasyonu ve demirin serbestleşmesi ile oluşan serbest radikallerin lipid peroksidasyonu başlatarak, serebral doku hasarına neden olduğu bilinmektedir(14).

SSS serbest radikallerin neden olduğu doku hasarına birçok faktörlerin etkisi nedeniyle daha yatkındır(15). Şöyleki, membran lipidleri, serbest oksijen radikalleri (SOR) ile kolayca reaksiyona giren kolesterol ve doymamış yağ asitlerinden zengindir. Beyin dokusunda, koruyucu faktörlerden SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri oldukça sınırlıdır. Serbest radikallerin oluşumunu tetikleyen demir açısından beyin dokusu oldukça zengindir. SSS beyaz ve gri cevherinde yüksek konsantrasyonlarda askorbik asit bulunur. Anti oksidan etkiye sahip olan askorbik asit tek başına yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu için travma ve iskemide kanın ekstrasvazasyonu sonucu açığa çıkan bakır ve demir iyonlarının varlığında fazla miktarda serbest oksijen radikalinin oluşumuna neden olur (15-19). Serbest oksijen radikalleri için iyi bir hedef olan lizozomlar nöronlarda oldukça fazla sayıdadır. Bu radikallerin lizozomal

membrana etkisi ile lizozomal hidrolitik enzimler nöronun sitoplazmasına salgılanır. Böylece otodestruksiyon olayı başlar ve doku hasarı tamamlanmaya kadar bu destrüktif olaylar zinciri devam eder.

Son yıllarda, primer iskemik veya travmatik lezyonları takiben gelişen sekonder beyin hasarını önlemek için bazı farmakolojik ajanlar kullanılmıştır(20,21).Bu amaçla kullanılan ajanların bazıları şunlardır; A, C ve E vitaminleri, Mannitol, Steroidler, 21-Aminosteroidler (22-24). Melatonin, etkinliği kanıtlanmış pek çok çalışmada serbest radikal tutucu etkisi gösterilmiş bir indolamindir(25-28). Melatonin, iyi bilinen bir diğer serbest radikal tutucu olan glutatyondan (bilinen en potent endojen serbest radikal tutucu) 5 kez, mannitolden ise (bilinen en potent eksojen serbest radikal tutucu) 14 kez daha etkindir. Bu özelliği in vivo ve in vitro olarak birçok çalışmada gösterilmiştir(26)

Çalışmamızın amacı SAK'ı takiben posterior sirkülasyonda ortaya çıkan SOR'ni ortadan kaldıran hücrel antioksidan enzimlerin (SOD, Katalaz, Glutasyon redüktaz, Glutasyon peroksidaz gibi) aktivitelerini incelemek, bu antioksidan enzim sistemini melatonin vererek korumak ve bu şekilde bu sistemin uzun süreli etkinliğini araştırmaktır. Bu yolla nörodejenerasyonun engellenebileceği/durdurulabileceğini test etmektir. Çalışmamızda serebral dokuda miktarı sınırlı bu anti oksidan enzimlerin oluşturulan deneysel SAK modelinde aktivite değişimlerini inceledik. Dışarıdan verilen ve çok kuvvetli bir serbest radikal tutucu olan melatonin ile bu enzimlerin aktivitelerini korumayı ve serebral ikincil hasarı engellemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

I- SAK

Serebral kan damarları ekstrakranial damarlardan belirgin farklılıklar gösterirler. Ekstrakranial yapıların büyük bir bölümünde arterial ve venöz yapılar organın hilus'undan geçerek beslenmeyi sağlarlar. Serebral damarlar ise sulkus ve fissürlerden beyin parankimine girmeden önce kolleteral bir ağ oluştururlar. Sadece küçük damarlar beyin parankimini penetre ederler. Büyük arterler ise çok az bir bağ dokusunun desteklediği subaraknoid boşluk ve sistemler ile çevrelenmişlerdir(29). İntrakranial arterlerdeki tunika medya düz kas hücrelerinden oluşmuş spiral bir ağ şeklindedir. Ekstrakranial damarlarla kıyaslandığında daha az musküler elemanlar ve elastik dokudan meydana gelmişlerdir.

Sinir sistemine bağlı hastalıklardan oluşan ölümlerin yaklaşık ¼' ü intrakranial kanamaya bağlıdır. (29). Eğer kanama primer olarak beyin parankiminden daha çok subaraknoid aralığa olmuşsa bu klinik durum subaraknoid kanama olarak adlandırılır ve patolojik özelliğinden çok klinik bir sendromdur. Ani başlayan baş ağrısı, meningeal irritasyon ve lumbal ponksiyon sonrası beyin omorilik sıvısında (BOS) kan bulunması yanında minimal fokal nörolojik bulguların bulunması klinik durumu tanımlar. Kadın ve erkekde görülme oranlarının eşit olmasına karşılık; kadınlarda mortalite biraz daha fazladır(29). Mortalite ve morbilite hızları da oldukça değişkendir ve yaşla birlikte artmaktadır. Literatürde bildirilen tüm vakalar hospitalize edilmiş bireylere aittir. Bunun yanında hastaneye ulaşmadan kaybedilen vakalar ise hiçde az değildir. İntrakranial anevrizma rüptürünü takip eden ölümle sonuçlanan 250 hasta üzerinde yapılan çalışmada bu hastaların %60' ının hemen rüptürü takiben öldüğü; sadece %11' nin ise 1 günden fazla yaşadığı saptanmıştır(30). Pakarinen' in serisinde(31) ilk kanamayı izleyen nedeni

belli olmayan SAK' ya bağlı mortalite hızı %40,6 bildirilirken anevrizma rüptürüne bağlı SAK' da mortalite hızı %43 olarak bildirilmiştir. SAK' dan sonra 6 ay yaşayan hastaların %50-70' nin daha önceki yaşam standardını yakaladığı görülmektedir.

SAK' lı hastaların yaklaşık 1/3' ünde başlangıçta uyarıcı hemoraji adı verilen hafif bir kanama meydana gelir. Bu dönemde başağrısı en sık karşılaşılan en karakteristik klinik semptomdur ve hastaların %85.3-97' sinde gözlenir. Başağrısı jeneralize veya lokalize olabilir. Genellikle ani başlayan, hastanın "tüm hayatı boyunca hissettiği en şiddetli başağrısı" olarak tanımladığı bir başağrısıdır. Başağrısı bulantı, kusma, vertigo ile beraber olabilir. Diğer uyarıcı bulgular ekstraoküler hareketlerin bozulması, motor veya duyu bozuklukları, boyun ve sırt ağrılarıdır. SAK' ı takibeden 6-24 saat içerisinde Brudzinski's ve Kernig's sign ortaya çıkabilir. Vücut ısısında hafif yükselme, fotofobi, hipertansiyon seyrek değildir. Rüptüre anevrizma vakalarının yaklaşık 1/3' ünde göz bulgularına rastlanılır (32). Optik sinir, kiazma veya optik traktustaki lezyona bağlı olarak görme alanı bozuklukları meydana gelir. Optik sinir kılıfındaki basınç artması bulanık görmeye neden olabilir. Retina ve vitreusa olan intraoküler hemorajiler oluşabilir ve bu durumda SAK için oldukça karakteristik olan subhyaloid kanamalar meydana gelir(33).

Sistemik semptomlar içerisinde ateş ilk 24 saat içerisinde gelişir ve meninks irritasyonunu gösterir. Eğer yüksek seyrederse hipotalamik bozukluğu yansıtır. Kusma, terleme, titreme, kalp atım hızında değişiklikler hipotalamik düzenleyici mekanizmaların bozukluğu ile ilgilidir. Hipotalamik bozukluk o denli şiddetli olabilir ki gastrointestinal kanamaya ve idrar retansiyonuna yol açabilir.

Nörolojik defisitler, hidrosefali, vasospazm sonucu gelişen enfarktüs, hematoma sonucu nöral dokunun doğrudan bası altında kalması ile ilgilidir. Fokal nörolojik defisitler arasında; kas gücünde azalma, konuşma bozuklukları, epilepsi, kranial sinir tutuluşları, visüel bozukluklar sayılabilir.

Laboratuvar bulguları olarak; Kan tablosunda lökositte artış ($15000-20000 \text{ mm}^3$) sıklıkla görülür. Eritrosit sedimentasyon hızında orta derecede bir yükseklik ateş ve lökositozaya eşlik eder. Kanda yüksek glukoz düzeyleri, glukozüri ve albüminüri bu semptomlara eşlik ederler.

Lomber ponksiyonda BOS renginin hemorajik kırmızı oluşu SAK tanısı için yeterlidir. SAK sonrası 4. saatte BOS patolojik görünüm alır. İlk 2 saat içerisinde BOS örneği alınırsa patoloji görülmez. BOS' da makroskobik olarak kanama görünümü 2. hafta sonunda kaybolur. Ksantokromi ise 30. güne kadar devam eder.

EKG' de SAK' lı hastalar kalp hızı ve ritminde belirgin, çarpıcı değişiklikler gösterirler. Saatler içinde klinik olarak aritmiler, EKG' de myokard iskemi ve enfarktüsündeki gibi ağır düzeyde T dalgası ve ST segmenti değişiklikleri görülebilir(34,35). Bu değişikliklerin nedeni kesin bilinmemekle birlikte sempatik sinir sisteminin aşırı aktivitesine bağlanabilir. Ağrı ve hipotalamik bozukluk ileri düzeyde taşikardiye neden olurken, artmış intrakranial basınç ile nabızda yavaşlama olacaktır.

SAK kuşkusu olan hastalarda kontrastsız bilgisayarlı beyin tomografisi (CT) kanamanın saptanmasında, kanamanın lokalizasyon ve yaygınlığı ile eşlik eden bir dizi komplikasyonun belirlenmesinde ilk başvurulacak yöntemdir. Güvenirliliği serilere göre değişmekle beraber sızıntı şeklindeki uyarıcı kanamalı olgularda %35 oranında negatif olabilmektedir(36). Kanamanın 5. gününden sonra yapılacak bilgisayarlı tomografi ile görüntülenmesi olasılığı hayli düşük olup, 7. günden sonra sıfıra yakındır.

Serebral anjiyografi lezyonun lokalizasyonunda, etyolojinin saptanmasında, çoklu anevrizmaların tesbit edilmesinde, kolleteral dolaşım ve vasküler anatominin vasospazmın derecesinin belirlenmesinde gereklidir. Magnetik rezonans görüntüleme ve serebral anjiyografi SAK nedeni olan vasküler patolojilerin belirlenmesinde en önemli iki yöntem haline gelmektedir. Kan ürünleri ve kan akımına duyarlılığından dolayı manyetik rezonans görüntüleme ile insidental anevrizmaların saptanması mümkündür.

II- SEREBRAL İSKEMİ

Strok ölüm ve sakatlığın en sık sebebidir. Her yıl ABD’de 500 000 kişi strok geçirmekte ve bunların yaklaşık ¼’ ü strok ve meydana getirdiği komplikasyonlar nedeni ile ölmektedir. Yapılan tüm tedavi alternatiflerine karşın malesef stroke tedavisi yetersiz kalmaktadır. İyi bir destekleyici tedavi ve yoğun rehabilitasyonla her stroklu hastaların büyük bir kısmı bir miktar düzelebilmektedir. Stroke ABD.’ de tüm yaş gruplarında kanser ve kalp hastalıklarından sonra 3. sırada yer alan ölüm nedeni olmaya devam etmektedir; sakatlıkların ise en büyük nedenidir. Stroke akut nörolojik hastalık tanısı ile hospitalize edilen hastaların tahminen yarısını oluşturmaktadır(37). Amerikan kalp derneği 1983 yılında 156.000 kişinin stroke nedeni ile öldüğünü ve yaklaşık 2.000.000 kişinin ise yaşamına devam ettiğini fakat hastalıktan etkilendiğini tahmin etmektedir.

Sendrom olarak stroke serebral damarların oklüzyonu veya spontan rüptürü; veya intrakranial damarların beyin parankimine veya subaraknoid aralığa kanaması sonucu ani olarak gelişen fokal nörolojik defisitle sonuçlanan klinik durumdur. Strok hastalarının retrospektif incelemesinde tüm strok sendromlarının %75’ini enfarktların, %11’ini intraserebral kanamaların, %5’ini ise subaraknoid kanamaların meydana getirdiği gösterilmiştir(38,39,40). Bundan dolayı yetişkin dönemde strok en fazla sakatlıklara ve ölümlere neden olan nörolojik hastalıktır. Hipertansiyonun kontrolü, serebral vasküler cerrahi ve antiagregan tedavi gibi koruyucu tedaviler strokun popülasyondaki riskini azaltmakta önemli bir role sahiptir.

A) İSKEMİK STROK SENDROMU

Arteriyel sirkülasyonun tutulumuna bağlı olarak fokal beyin iskemisinin gelişmesi ve bunun sonucu olarak bir dizi semptom ve bulguların geliştiği klinik bir sendromdur. Hastanın semptom ve bulguları (Örneğin afazi, amorozus fugaks, internükleer oftalmopleji) arteriel

sirkülasyonun tutulduğunu gösteren en önemli kanıtlardır. Klinik bulgular BBT, MRG ve serebral anjiyografi ile desteklenebilir.

Serebral kan akımı 15 ml/100 g beyin dokusu/dakikanın altına indiği zaman, nöron fonksiyonlarında azalma meydana gelir. Birkaç dakika veya saat içerisinde serebral kan akımı normal seviyesine dönerse nöronal fonksiyonlar düzelir. Fonksiyondaki bu ara vermeye transial iskemik atak adı verilir.

Bu durum fokal olabilir; jeneralize ise senkop meydana gelir. Eğer perfüzyon düzeltilemezse metabolik kollaps meydana gelir ve iskemik enfarktüs klinik strok ile sonlanır. Serebral arterial oklüzyon veya azalmış kan akımı bir dizi patofizyolojik süreç sonucu beyin iskemisine neden olur. Ateroskleroz, arterit veya travma gibi arteriel hastalıklar kan akımını azaltarak stenoza veya trombüs formasyonuna neden olabilir. Kardiyak ritm bozuklukları, kalp kapak hastalıkları ve myokardiyal hastalıklar trombus formasyonuna neden olarak sıklıkla serebral damarlara olmak üzere sistemik embolizasyona neden olabilirler. Fokal iskemik semptomlar SAK' da ve muhtemelen migrende oluşan serebral arteriyel vasospazm sonucu meydana gelebilir. Ek olarak iskemik beyin alanından salınan vasokonstrüktör maddelerin üretimi trombotik veya embolik oklüzyona neden olarak iskemik alanın genişlemesine yol açarlar. Kan elemanlarındaki benzer değişiklikler polisitemi ve hiperviskozite durumlarında olduğu gibi mikrosirkülasyonu bozarak fokal iskemi oluşumuna neden olurlar. Beyin dokusunun kollateral dolaşımı yeterli ise stenotik veya oklüziv arteriel lezyonlar enfarktüs ile sonlanmazlar.

Akut serebral iskeminin patofizyolojisini anlamak için iki ayrı kavramı bilmek gerekir. Birincisi, çeşitli nöronal fonksiyonların yerine getirilebilmesi için spesifik kan akımı eşik değerleri mevcuttur. Eğer kan akımı elektriksel aktivite eşik değerinin altına düşerse kortikal fonksiyonlar durur. Bununla beraber membran pompa yetmezliğine neden olacak eşik değerine kadar nöronlar canlılığını korur ki bu eşik değerinin altına inince ise kalıcı doku hasarı meydana

gelecektir. İkinci kavram ise “iskemik penumbra” dır. İskemik beyin elektriksel aktivite eşik değerinin altında perfüze olmaktadır fakat, perfüzyon, membran pompası eşik değerinin üzerindedir. Bu durum iskemik penumbra olarak adlandırılır. Beynin bu bölgesindeki nöronlar fonksiyonel değildir, fakat enfarkta da uğramamışlardır. Klinik izlem bu bölgeye yeniden normal kan akımı olursa kortikal fonksiyonun en kısa zamanda geri dönebileceği yönündedir. İskemik penumbra akut serebral iskemide serebral kan akımının arttırılması ile düzelebilir. Hossman(41) akut fokal iskemide primer tedavinin enerji üretim mekanizmalarının yıkılmasının önlenmesi ve nöronal membran polarizasyonunun korunması olduğunu ileri sürmüştür. Bu ise iskemik alana kritik eşik değerin üzerinde kan akımı sağlanması ile veya iskemik nöronların enerji ihtiyacını azaltmakla sağlanabilir(41).

İskemik strokda mortalite ve morbiditeyi azaltmak için yapılan çalışmalar 3 majör grupta yoğunlaşmıştır. Bunlardan birincisi, strokda risk faktörlerini tanımlamak ve bu risk faktörlerini ortadan kaldırmaktır. Yüksek kan basıncının uzun dönem kontrolü iskemik strok insidansını azaltmaktadır. Diğer tedavi edilebilen risk faktörleri diabetes mellitus, kalp hastalıkları, hiperlipidemi ve geçici iskemik ataklardır. İkinci grupta geçici iskemik atak ve strokda en sık karşılaşılan vasküler lezyonların (örneğin karotid arterlere ait arteriyosklerotik hastalıklar gibi) medikal ve cerrahi tedavileridir. Üçüncü grup ise peri iktal dönemde karşılaşılan serebral iskeminin akut tedavisidir.

SAK' lara bağlı olarak gerek anterior gerekse posterior sirkülasyon bölgesinde değişik nedenlere bağlı olarak iskemi meydana gelebilmektedir. Bunlardan anevrizmalara bağlı SAK sonrası serebral iskemi gelişiminin sık görülen nedenleri şu şekilde özetlenebilir(42).

1- Serebral vazospazm:

2- Hipotansiyon.

a- Santral: Medullar kompresyon, hipotalmik disfonksiyon ve buna bağlı nörojenik ve hümoralempatik deşarj.

b- Sistemik: Kardiyak aritmiler, kardiyak output'un azalması gibi sistemik sempatik deşarja bağlı olarak, iatrojenik antihipertansif tedaviye bağlı.

3- Hipovolemi, dehidratasyon ve eşlik eden hiponatremi: SAK sonrası ilk dakikalar içinde özellikle diastolik kan basıncı nörojenik ve hümorale sempatik deşarja bağlı olarak artar. Ancak kan basıncı ilerleyen günler içinde hastaların büyük kısmında düşmektedir. Bu kardiyak output'un azalması gibi sistemik veya iatrojenik nedenlere (yatak istirahati, uygunsuz ADH salınımına yönelik su kısıtlaması) bağlı olabilir. Hiponatremi'nin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte üzerinde en çok durulan iki hipotez vardır: Bunlar hipotalmik disfonksiyona bağlı uygunsuz ADH salınımı ve Atrial natriüretik salınımı (Cerebral Salt Wasting Syndrome).

4- İntrakranial basınç artışı: Yeniden kanama, hidrosetali, intraserebral hematom, hipoksi, iskemik ödem gibi nedenlere bağlı olarak oluşur.

5- Respiratuar bozukluklar: Hipoksi, hiperkapni ve asidoz serebral iskemi gelişimini artırır.

6- Metabolik bozukluklar: Sempatik hiperaktivite sonucu kortizol, katekolamin ve growth hormon salınımının artması ile glüköz toleransı azalır. Takibeden hiperglisemi buna bağlı serebral laktik asidoz serebral hasara neden olur.

B) ANTERİOR VE POSTERİOR İSKEMİ

Anterior sistem etkilenmiş ise bulgular hemiparezi, hemihipoestezi, görme bozuklukları disfazi bilinç değişiklikleridir. Posterior sistem etkilenmiş ise bulgular dizartri, diplopi, vertigo, ataksi, solunum düzensizlikleri ve bilinç değişiklikleri ve ani ölümler şeklinde ortaya çıkar.

III- SEREBRAL VAZOSPASM

A) TANIM VE TARİHÇE

İntrakranial arterial vazospazm radyolojik, histopatolojik ve klinik bir fenomendir. İntrakranial anevrizma rüptürü, kafa travması, hipotalamik-pitüiter cerrahi ve pek çok başka nedenle oluşabilir. Dramatik bir fenomen olan serebral vazospazm (VSP) ilk defa 1951 yılında Ecker ve Riemenschneider tarafından anjiyografik olarak gösterilmiş ve bundan damar duvarına uygulanan traksiyonun sorumlu olduğunu düşünülmüştür(43). VSP anevrizma vakalarının % 30-50'sinde görülür. Buna karşın anevrizma negatif olgularda görülme insidansı % 1'dir. Anjiyografik VSP, subaraknoid kanamayı takip eden, majör serebral arterlerin semptomatik veya asemptomatik anjiyografik daralması, başka bir deyişle majör serebral arterlerdeki kontrast madde sütununun daralmasıdır. Klinik VSP ise serebral arterial daralmayı takip eden iskemik sürecin ifadesi olup daima nörolojik fonksiyon kaybı ile birlikte dir. Bu olay geri dönebilen uzamış iskemik nörolojik defisitten(PRIND) serebral enfarkt oluşumuna kadar değişebilir. Delayed İskemik Defisit SAK'larda vazospazma bağlı oluşan tablodur. VSP, SAK'ı takip eden 3. günden sonra oluşmaya başlar ve 4.-12. günler arasında sıklıkla ve çoğunlukla oluşur. Bu günlerde geç (Delayed) vazospasmdan söz edilir(42).

B)SINIFLANDIRMA VE İNSİDANS

Yaşargile(44) göre vazospazm; lokal, multisegmental veya diffüz olabilir. Bir başka sınıflandırması ise mild (%25 damarın daralması), moderate (% 50 damarın daralması) ve severe (% 75 ve üzerinde daralma) şeklindedir. Anjiyografik vazospazm gecikmiş, iskemik vazospazmdan yaklaşık iki kat daha fazla görülür. Bunun nedeni büyük bir olasılıkla serebral otoregülatuar mekanizmaların kişiden kişiye farklı olması ve benzer patolojilerde farklı yanıtların oluşmasıdır. Travmatik SAK, tümör kanaması, AVM kanaması vb. patolojilerde

vazospazma yol açabilirlerse de en yaygın etiyolojik sebep anevrizma ruptürüne bağlı SAK'tır. Tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen serebral vazospazm SAK geçiren insanların mortalite ve morbiditelerinde önemli bir faktördür. yoğun tedaviye rağmen bu hastaların %15' strok veya ölüm şeklinde etkilenirler. 1987'de yapılan "The Cooperative Aneurysm Study" çalışmasının sonuçlarına göre SAK'a bağlı VSP görülme sıklığı; anjiyografik VSP %50, semptomatik VSP %32 dir(45).

Subaraknoid kanamaya bağlı olarak gelişen vazospazm, olayın beyin dokusunda geçmesi bakımından daha önem kazanmaktadır. Öncelikle santral sinir sisteminin iskemiye toleransı, vücudun diğer organlarına göre çok daha azdır. Bunun yanında majör serebral arterler tek anatomik bölgeyi beslerler, bu nedenle vazospazma uğrayan arterin beslediği bölge diğer arterlerce yeterince kanlanamadığından harabiyet büyük olmaktadır. Vücudun diğer yerlerinde (periton, plevra vs.) damarlar gibi koruyucu ve sınırlayıcı örtülerle kaplıdır, bu nedenle kanama halinde diğer damarlar bundan etkilenmezler ancak beyinde damar sistemi bir aradadır. Bu da masif kanamanın varlığında birden fazla büyük damarın etkilenme ihtimalini artırır (46). Serebral VSP'in mekanizması Willis poligonundan çıkan büyük çaplı arterlerden birinin beslediği alanda fokal veya global serebral kan akımının (SKA) azalmasıdır. Pekçok araştırmacı VSP'deki kliniğin ortaya çıkışını SKA'daki azalmaya, serebral mikrosirkülasyondaki bozukluğa veya distal mikroembolilere bağlayarak açıklamışlardır. Powers ve ark.(47) 1985te yaptıkları bir çalışmada Positron emission tomografi (PET) ile artmış SKA'nı, artmış kan volümünü ve artmış oksijen salınımını etkilenen arter alanındaki lokal iskemide göstermişlerdir. Crompton ve ark(48) 1964 te vazospazm sonrası gelişen serebral enfarktın CT ve otopsi bulguları ile serebral büyük arterlerin dağılım alanındaki iskemi arasındaki uyuma dikkat çekmişlerdir.

Angiografik vazospazm 3. ile 5. günler arasında ortaya çıkar, 5 ile 14. günlerde maksimum olur ve 2. ile 4. haftalarda dereceli olarak azalır. Vazospazmın klinik bulguları etkilenen arterin lokalizasyonuna ve etkilenme şiddetine, hastanın yaşına, hastanın klinik

durumuna, komplikasyon faktörlerinin varlığına (hipertansiyon, hipotansiyon vb.), kollateral sirkülasyonun varlığına bağlıdır. Angiografik olarak VSP gösterilen hastaların yaklaşık yarısı asemptomatiktir. Anterior sistem etkilenmiş ise bulgular hemiparezi, hemihipoestezi, görme bozuklukları disfazi bilinç değişiklikleridir. Posterior sistem etkilenmiş ise bulgular dizartri, diplopi, vertigo, ataksi, bilinç değişiklikleri ve solunum düzensizlikleri şeklinde ortaya çıkar. Nörolojik bulguların başlangıcında sıklıkla ateş menenjizm ve non spesifik bir sersemlik hali vardır. Başlangıçta bulgu ve belirtilerin ortaya çıkışı intravasküler volümün veya kan basıncının değişikliklerine göre dalgalanma gösterebilir. Semptomatik vakaların yaklaşık %50'sinde kalıcı serebral enfarkt gelişir kalan hastalarda angiografik vazospazma rağmen defisitsiz tam iyileşme mümkündür. Bugüne kadar çalışmalar subaraknoid kanama sonrası klinik vazospazmın gelişmesinde çok sayıda mekanizmanın karmaşık ve iç içe bir düzen içinde yer aldığını göstermektedir. 1970'li yılların başında Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın serebral vazokonstrüksiyon yaptığı görülmüş ve gerek ortama çıkan kan ürünleri gerekse damar duvarında oluşan araşidonik asit metabolitleri detaylı olarak araştırılmış ve vazospazmın etyolojisinde önemli rol oynadıkları düşünülmüştür.

C) VAZOSPAZM İLE İLGİLİ TEORİLER

Vazospazm teorileri kısaca şu şekilde gruplandırılır.

1) Echlin (1965) ve Ark.'larının(8) öne sürdüğü teori: Intracranial arterlerin düz kas hücrelerini besleyen vasovazorumları yoktur. Vazovazorumlar yerine Tunika adventisya üzerinde subaraknoid mesafeyi mediadaki düz kas hücrelerine bağlayan labirintin bir yapı vardır. Bu teoriye göre büyük damarların adventisyası çevresinde kanın bulunması vazospazma yol açmaktadır. Burada kandan salınan maddelerin, ve bunların değişik komponentlerinin bir çeşit vazoaktif kimyasallar olarak adventisyaadan, bu kanallar aracılığı ile arter duvarına girdiği ve orada etki gösterdiği düşünülmüştür. Ayrıca subaraknoid mesafedeki kanın mekanik olarak etki

ederek, bir çeşit blok yapar. BOS dolanımı, arterin beslenmesi ve atıkların temizlenmesi işlemi bozular. Vazospazm agrave olur.

2) Vasküler endotelyumdaki değişiklikler: Vasküler endotelin damar düz kas tonusunu etkileyen en önemli komponentidir. Vasküler endotelyum, vazodilatatör ve vazokonstrüktör maddeler salar. Değişik ajanlar örneğin asetilkolin ve bradikininler, damar endotel hücrelerinden bir veya birçok maddenin salınımına neden olur. Bunlardan en önemlisi EDRF (Endotel-derived relaxing faktör) dir. Son yıllarda EDRF' nin Nitrik oksit (NO•) olduğu kabul ediliyor. Bu madde damar duvarındaki düz kaslarda vasküler relaksasyona neden olur. Buradan hareketle periarteriyel kan pıhtısından salınan oksihemoglobinin normal EDRF fonksiyonları ile etkileştiği, bununda uzamış vazokonstrüksiyona yol açtığı ifade edilmektedir. Vasküler endotelden salınan en önemli vazokonstrüktör madde Endotelin 1 (ET₁) ve ET₂ dir. Endotelin endotel hücrelerinden salınan bir peptittir ve son derece kuvvetli bir vazokonstrüktördür. Bu maddenin salınımında sitotoksinler ile karşılaşan endotel hücrelerinde ET₁ yapımı artar. Bir başka deyişle majör spazmojenik ajan oksihemoglobindir(49-51).

3) Albin ve Arkadaşları immünolojik mekanizmalarla vazospazmın ortaya çıktığını öne sürerler(52,53). SAK geçirmiş ve vazospazmı bulunan hastaların serumlarında C₃ immün kompleks miktarının yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Bu immün kompleks konsantrasyonunun 3-7. günler arasında arttığı sonra ise giderek azaldığı gösterilmiştir. Bir başka deyişle, vazospazm başlangıcı yüksek immün kompleks ile başlıyor. Düşmesi ile vazospazm azalıyor. Bununla birlikte bu immünolojik fenomenlerin etkilendiği tam olarak bilinmiyor.

4) Hipotalamik injury ve denervasyon hipersensitivitesi ile ilgili teori: Serebral arterler kan ile karşılaştığında (SAK olduğunda) adrenerjik inervasyon kaybı oluyor(54). Buda denervasyon hipersensitivitesine yol açıyor. Böylece teorik olarak vazospazma neden oluyor. İntrakraniyal anevrizma rüptürü olunca kafa içi basıncı yükselir ve anterior hipotalamus bundan etkilenerek zedelenir. Bu esnada sempatik hiperaktivite olur. Bununla kalpde de zedelenme ve

elektrokardiyografik değişiklikler oluşur. Peerless ve Griffiths(55) SAK 5-10. günlerinde noradrenalin ve adrenalinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Hipotalamik injüriyi destekleyen diğer bir kanıt ise, değişik intrakraniyal olaylarda (Örneğin; kafa travması, enfeksiyonlar veya hipotalamus bölgesindeki operasyonlarda) hipotalamik bölgede zedelenme olur ve bunlarda da vazospazm görülebilir.

5) Nöronal mekanizma teorisi: Bu teori Svendgnard(56,57) ve ark.' ları tarafından öne sürülmüştür. Bu teoriye göre; serebral arterleri inerve eden nöronlar monosinaptik olarak nucleus tractus solitariusa projekte olurlar. Subaraknoid mesafedeki kan bir sinyal doğurur. Bu sinyal serebral arterleri inerve eden afferent sinir lifleri ile nucleus tractus solitariusa taşınır. Bu afferent sinirlerin ganglionları, anterior sirkülasyonu taşıyanlar, trigeminal gangliyondadır. Posterior sirkülasyondaki ise üst iki spinal gangliyondadır. Bu yolla medulla oblangatanın A₁ ve A₂ bölgesine ulaşır. A₂ bölgesi, nucleus tractus solitariusun bir kısmıdır. A₂' den kalkan uyarılar, hipotalamusdaki paraventriküler ve supraoptik nucleus ile median eminense gelirler. Paraventriküler supraoptik nucleus bölgesinden vazopressin salgınır. Bu madde akut vazospazm başlangıcında önemlidir. Median eminens bölgesinden bugün için tam olarak bilinmeyen spazmojenik maddeler salgınır. Buda sempatik sistem ile kronik spazmda rol oynar deniliyor.

D)VAZOSPAZM İLE İLGİLİ TEDAVİ VE GÖRÜŞLER

1950'li yıllarda vazospazmın mekanik distorsiyon ve nörojenik reflekslerinin sonucunda geliştiği düşünülürken 1960'lı yıllarda Echlin(8) ve Kennady tarafından maymun ve köpeklerde yapılan çalışmalarla ilgili subaraknoid mesafede aşırı miktarda bulunan kan ve kan elemanlarının varlığına çevrilmiş ve 1965 yılında Echlin tarafından deneysel SAK ile vazospazm modeli ilk olarak gerçekleştirilerek kan ve daha az oranda kan ürünleri ve seratoninin vazospazm yaptığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bazillar ve vertebral arterlerde mekanik stimülasyon ile sadece stimülasyon alanında lokal ve belirgin ancak kısa süreli (3-10 dakika) vazospazm geliştiği, pial

damarların elektiriksel stimülasyonu ile 5-30 dakika süreli lokal vazospazm oluştuğu, vertebral ve basillar arterler üzerine kendilerini çevreleyen araknoid membran açılmadan otolog taze kan damlatılması ile belirgin vazospazm gelişmediği ancak çevreleyen araknoid açıldığı zaman 5-20 dakika süren özellikle çapı geniş arterlerde daha belirgin olan ve non-refrakter karakterlerde vazospazm oluştuğu, oluşan vazospazmın kan ile temas eden damar segmenti ile sınırlı kaldığı belirtilmiştir. Bu dönemde subaraknoid mesafenin özellikle "fibrinolysine" gibi fibrinolitik ajanlarla irrigasyonu ilk olarak denenmiştir.

1970'li yıllarda primatlarda kronik vazospazm anjografik olarak demonstre edilmiş(12). Suzuki ve arkadaşlarının(11) yaptığı çalışmalarda hastaların bir kısmında 1.günde gözlenmeyen vazospazmın 2. ila 5.günler arasında sıklıkla ortaya çıktığı ve bu sürenin 3 haftaya kadar uzayabildiği, anjiografik erken vazospazmın cerrahi tedavi için kriter olamadığı, bu hastaların subaraknoid kanamayı takip eden ilk iki gün içinde opere edilmesinin bazal arterleri çevreleyen vazospazm ve takibeden iskemi gelişimini azalttığı vurgulanmıştır(11,58)

1970 yılında Iwayama ve arkadaşları(59) tarafından rat anterior serebral arterini ultrastrüktürel olarak incelenmiş ve periadventisial ve derin adventisial yerleşimli iki grup aksonun ve akson terminallerinde sinaptik veziküllerin varlığı saptanarak bunların bir kısmının adrenerjik bir kısmının ise kolinerjik olduğu düşünülmüştür. 1971 yılında Peerless ve Yaşargil(55) tarafından Florosan-histokimya tekniği ile serebrovasküler adrenerjik innervasyonun araştırılması ve özellikle anterior sirkülasyonda ve arterial sistemde belirgin olmak üzere damar adventisiyasında derin yerleşimli olarak uzanan, musküler tabakaya penetre olmayan, adrenerjik terminallerin varlığı detaylı olarak gösterilmiş ve süperior servikal gangliondan çıkan bu aksonların hem damarın mekanik torsiyonu hem de SAK'da kanın damar duvarına teması ile katekolamin deşarjına neden olarak vazospazma yol açtığı düşünülmüştür. Takip eden dönemde yapılan çalışmalar bu bulguları desteklemektedir(60,61).

Soito ve arkadaşları(9) tarafından yapılan çalışmalarda vazospazmın genellikle SAK sonrası 3-4 günlerde geliştiği, 4-6 günlerde maksimuma ulaştığı ve yaklaşık iki hafta içinde yatıştığı, SAK sonrası subakut (4-7 günlerde) dönemde opere edilen hastalarda mortalitenin erken dönemde (ilk üç gün) cerrahi uygulanan hastalara oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak SAK sonrası ekstrasvaze olan kanın 4. günden itibaren yıkım ürünlerinin oluşarak damar media tabakasında nekroza yol açtığı ve bu süreç başladıktan sonra subaraknoid mesafedeki kanın temizlenmesinin pratik bir anlamı olmadığı buna karşın ilk 3 gün içinde opere edilen hastalarda ortamdan pıhtının uzaklaştırılması ile kan yıkım ürünlerinin etkisinin önlendiği düşünülmüştür. Sonuç olarak subakut dönemde orta serebral arter ve A₂ anevrizmaları hariç (sadece fokal vazospazma yol açtığı ve bunun sonucunda hiçbir zaman diffüz iskemi gelişmeyeceği düşünülerek) cerrahi tedaviden kaçınılması gerektiği ve bu süreç içinde hipotansif tedavi ile birlikte verilmesi önerilmiştir.1970'li yıllarda yapılan klinik ve deneysel çalışmaların sonuçları, vazospazmın eritrosit yıkım ürünlerinin serebral damarları etkilemesi sonucu geliştiğini düşündürmüştür. Yine bu dönemde ilk defa PET ile yapılan çalışmalar yayınlanmıştır. Grubb ve arkadaşları(62) tarafından yapılan araştırmada, SAK'da serebral kan akımı ve O₂ tüketiminin vazospazm olsun veya olmasın azaldığı ancak bu artışın vazospazmın derecesi ile doğru orantılı olduğu, buna karşın spazm gelişen arter dağılımında serebral kan volümünün belirgin olarak arttığı bildirilmektedir(62). Serebral kan volümünün artışına neden olarak, radyolojik olarak görüntülenebilen ekstraparenkimal arterlerde spazm olması ve buna karşın iyi görüntülenemeyen intraparenkimal damarlarda vazodilatasyon gelişmesi gösterilmiştir.

Saito ve arkadaşları(10) tarafından 1979 yılında yayınlanan diğer bir çalışmada, 44 hastalık bir seride pre- ve postoperatif vazospazmın CT ve anjiyografi bulguları, klinik semptomlar göz önüne alınarak karşılaştırılmış ve anjiyografik vazospazmın SAK sonrası 5-7. günlerde başladığı, 1 hafta içinde maksimuma ulaştığı, nörolojik semptomların anjiyografik

vazospazmın başlamasından 1-2 gün sonra ortaya çıktığı, CT bulgularının ilk olarak nörolojik semptomlar başladıktan birkaç saat sonra görülebildiği ve takip eden dönemde infarkt alanı ve buna bağlı ödem nedeni ile zaman içinde değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Aynı makalede spastik arterlerin ancak % 40 ve üzerinde bir oranda daralması ile nörolojik bulguların ortaya çıktığı ve bu oranın kritik nokta olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Weir ve arkadaşları(13) tarafından yapılan klinik çalışmada 627 hastanın anjiyografileri üzerinde subaraknoid mesafe, kafa kadesi ve boyunda yer alan damarların çapları değişik zaman dilimlerinde ölçülerek anjiyografik vazospazmın SAK'dan 3 gün sonra başladığı, 6 ila 8.günler arasında maksimuma ulaşarak 12.güne kadar uzadığı ve vazospazmın derecesi ile mortalite hızı arasında pozitif korelasyon bulunduğu bildirilmiştir.

1982 yılında George Allen ve arkadaşları tarafından selektif bir kalsiyum antagonisti olan Nimodipine ile yapılan ilk klinik çalışma yayınlanmıştır(6,63). Takip eden dönemde nimodipinin subaraknoid kanama sonrası mortalite ve morbiliteyi değişik derecelerde etkilediğini belirten klinik ve deneysel çalışmalar bildirilmiştir.

1969 yılında McCord ve Fridovich(64) tarafından süperoksit dismutaz (SOD) enziminin bulunması ile serbest radikallerin ayrıntılı olarak çalışılması mümkün olmuştur. 1980 sonrasında özellikle Sano ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ve bilirubin, globin ve demire yıkılması ile oluşan serbest radikaller ve takiben oluşan lipid peroksidlerin, doğrudan ve araşidonik asit metabolizması üzerinden, sitotoksik etki oluşturarak subaraknoidal kanama sonrası vazospazmın oluşumunda potansiyel rol oynadıkları saptanmıştır(15,42,65,66).

IV-SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest oksijen radikallerinin (SOR) birçok hastalığın ve doku hasarının fizyopatolojisinde rol aldıkları bilinmektedir(67). İleri derecede reaktif olan bu moleküllerin,

son yıllarda serebral iskemi ve kafa travması gibi beyin zedelenmesine neden olan durumlardan sonra gelişen beyin disfonksiyonunda ve beyin hücresi ölümünde rollerinin olabileceği savunulmaktadır. Kafa travması ve serebral iskemi sonrasında artan SOR'in endotel hücresi hasarına yol açarak kan-beyin bariyerini bozdukları ve beyin ödemi oluşturdukları düşünülmektedir(68).

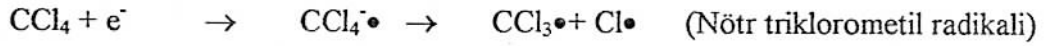
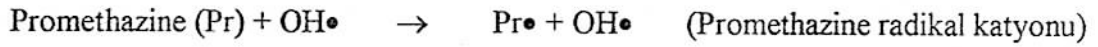
A) SERBEST RADİKALLER ve REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

Bir atom veya molekülün yapısındaki elektronlar, çekirdeğin etrafında yer alan ve yörünge denilen yapılarda bulunurlar. Her bir yörünge iki adet elektron içerir. Eğer yörüngede bir elektron var ise bu elektron çiftlenmek eğilimindedir. Serbest radikal, dış yörüngesinde çiftlenmemiş yani serbest bir elektron bulunduran atom veya molekül demektir(18,67,69-71). Çiftlenmemiş elektron, molekül formülünün yanına ilave edilen bir nokta (•) ile belirtilir. Bu tek elektron çiftlenmek eğiliminde olduğu için serbest radikaller ileri derece reaktiftirler(69,72). Serbest radikal reaksiyonları normal biyolojik olaylarda geniş bir spektrum içinde yer alır ve birçok hücrel enzim ve elektron transport sistemi, katalitik fonksiyon doğrultusunda ara ürün olarak sınırlı miktarda serbest radikalleri oluştururlar. Normal fizyolojik koşullarda oluşan bu serbest radikaller, biyolojik korunma mekanizmaları ile ortamdaki uzaklaştırılır. Ancak bazı patolojik süreçlerde reaksiyonların ara kademelerinde serbest radikallerin aşırı miktarlarda üretilmesi ve/veya biyolojik koruyucu sistemlerin çalışmaması gibi durumlarda istenmeyen etkilere yol açarlar.

İnsan vücudunda pekçok serbest radikalın varlığı gösterilmiştir. Bunlar molekülün yapısına göre oksijen merkezli (örn. süperoksit radikal, O_2^{\bullet}), sülfür merkezli (örn. glutatyon radikal, GS^{\bullet}), karbon merkezli (örn. CCl_3^{\bullet}) vb olarak isimlendirilirler (73). En sık karşılaşılan oksijen merkezli radikallerdir. Moleküler oksijenin (O_2) dış yörüngesinde iki adet çiftlenmemiş elektron bulunduğu 1924 yılından beri bilinmektedir. Moleküler oksijen bu

özelliği ile kuvvetli bir oksidan ajandır(74), her bir molekülü bir çift elektron kabul edebilir. Ancak molekül yapısındaki kısıtlamalardan dolayı bir anda yalnız bir elektron alabilir ve bu nedenle radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonu yavaşır(72). Eğer moleküler oksijen, bir atom veya molekül ile reaksiyona girerse ondan bir elektron alır ve böylece oksijenin indirgenmiş, reaktif serbest radikalleri oluşur(67,72). Oluşan serbest radikaller, hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler ortama da geçer ve uzak etkilerini oluştururlar. Burada serbest radikalın çözünürlüğü ve diffüzyon hızı önem kazanmaktadır. Oksijen merkezli serbest radikaller incelendiğinde hidroksil radikali çok potent olmasına rağmen, diffüzyon hızı çok daha yavaştır ve bu nedenle ancak oluştuğu yerde ya da yakınında etki gösterir. Buna karşın H₂O₂ çok az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilir(69,75).

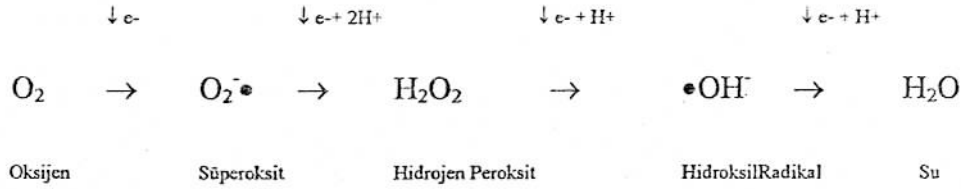
Serbest radikaller pozitif, negatif yüklü veya nötr olabilirler. Örneğin:



Serbest radikaller homolitik bağların açılması veya elektron transfer reaksiyonları ile oluşurlar. Bu değişiklikler iyonize radyasyon, noniyonize radyasyon, ultraviyole ışığı, ısı enerjisinin absorpsiyonu ile veya enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonu, transizyonel (geçişli) metaller tarafından katalizlenen reaksiyonlar ya da enzimatik reaksiyonlar gibi redox reaksiyonları tarafından oluşturulur(75).

Günümüzde SOR yerine daha kapsamlı olan ve hem süperoksit, hidroksil radikalleri gibi oksijen içeren radikalleri, hem de aslında radikal olmayan ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit, singlet oksijen, O₃, hipoklorik asit gibi molekülleri içine alan "Reaktif Oksijen Türevleri" (ROT) terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır(65,76). ROT termodinamik stabilitelelerini kazanmak için, yakında bulunan

diğer moleküllerden elektron veya H^+ atomlarını serbestleştirmeye çalışır ve bu molekülleri aktif radikal haline getirir. Başka bir ifade ile kendileri kimyasal olarak reaktiftir(19). Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu şu şekilde özetlenebilir(20,28).



Görüldüğü gibi oksijen molekülünün bir e^- kabul etmesi ile süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), iki e^- kabul etmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2), üç e^- kabul etmesi ile hidroksil radikali ($\bullet OH$) oluşmakta ve dördüncü e^- 'un eklenmesi ile su oluşmaktadır.

B-SERBEST OKSİ-RADİKALLER

1-SÜPEROKSİT RADİKAL ($O_2^{\bullet-}$) : Oksijen molekülünün bir elektron kabul etmesi ile oluşur. Süperoksit radikali en çabuk ve en kolay oluşan radikaldir ve aktivitesi kısmen düşük olduğu halde diğer radikalleri oluşturduğu için önemlidir. Oksijen toksisitesinin ana faktörüdür. Diğer radikallerin oluşması $O_2^{\bullet-}$ birikimine bağlıdır. Oluşumuna etki eden faktörler iki grupta incelenir.

a) Çevresel faktörler: Bütün yüksek enerjili elektromagnetik dalgalar (alfa, beta, gamma) oksijenden $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna neden olur. Ayrıca organik moleküllerin bulunduğu ortamda $O_2^{\bullet-}$ oluşumu iki kat daha artar.

b) Enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar: Katekolaminlerin, tiollerin, ferrodoksinin ve hemoglobinin otooksidasyonu ile de $O_2^{\bullet-}$ oluşur(77-79).

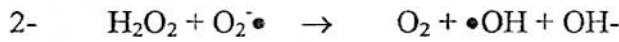
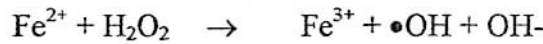
2-HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) : Oksijen molekülüne iki adet elektron eklenmesi ile oluşur. Sulu ortamlarda $O_2^{\bullet-}$ de dismutasyona uğrayarak H_2O_2 oluşturur(18,69). Hidrojen peroksit aktivitesi en düşük olan radikaldir ve aerob organizmalarda, mitokondrial elektron transportu sırasında oluştuğu ilk olarak 1966 yılında Jensen(69,79) tarafından saptanmıştır.

Mitokondrial süperoksit ve hidrojen peroksit üretimi normalde mitokondrial oksijen tüketiminin % 1-2'si oranında görülür(28) ve mitokondrial süperoksit dismutaz (SOD) enzimi etkisi ile süperoksit radikal konsantrasyonu minimal düzeyde tutularak oluşan süperoksit radikalının sitoplazmaya geçişi engellenmeye çalışılır. H_2O_2 hücreyi penetre ederek içeri girer, ATP seviyesini düşürür, hücre membranını, DNA, Ca^{++} rezervuarlarını ve mitokondriya gibi hedef organları tahrip eder. H_2O_2 gibi radikaller yüksek konsantrasyonda olduklarında hücrenin saniyeler içinde parçalanmasına yol açarlar.

3- HİDROKSİL RADİKAL ($\bullet OH$) :Oksijen molekülüne üç adet elektron eklenmesi ile oluşur. Haber ve Weis(80-82) ilk kez 1934'te hidrojen peroksit ile süperoksit radikalın reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturduğunu gösterdiler. Hidroksil radikali bu grupta en potent serbest radikaldir ve oluşması için ortamda demir (Fe) veya bakır (Cu) gibi transizyonel metallerin varlığı gereklidir. Transizyonel bir metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar Fenton reaksiyonları olarak bilinir:



Yine Haber-Weis reaksiyonu ile ortamda bir transizyonel metalin varlığında süperoksit radikali hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini oluşturur(80-82).



İn vivo koşullarda hidroksil radikal meydana gelmesine neden olan önemli reaksiyonlar şunlardır.

■ er molekülleri,
■ rganik asitler)

■ ikaller bir tür
■ ksik etkilerinin

— Son yıllarda
ARDS'de ve

—6).

■ n antioksidan

■ idan sistemler

■ anlar azalırsa

■ açılmaz bir

Sonuç olarak

■ n-antioksidan

■ /1 kırar; lipid

■ ciddi biçimde

bozar(19,88).

Lipid peroksidasyonun son ürünleri aldehidler, hidrokarbon gazları, ve malondialdehidtir. Yıkım ürünleri zincir reaksiyonun uzağına difüze olur ve hücre ödemi, vasküler permeabilite artışı, inflamasyon, kemotaksise neden olur; fosfolipaz aktivitesi değışir; araşidonik asit salınımı olur. Serbest radikallerin reaktiviteleri difüzyon mesafeleri ile ilgilidir. Açığı çıktıkları yerlerden çok uzaklara difüze olarak yapısal proteinlerin oksidasyonu veya lipid peroksidasyonu gibi duyarlı yüzeylerin istenmeyen reaksiyonlarına neden olurlar.

C- SERBEST RADİKALLERİN HÜCRESEL KAYNAKLARI

1- Küçük Moleküllerin Oto-oksidasyonu:

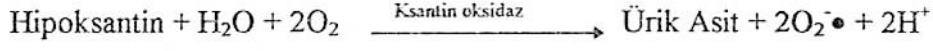
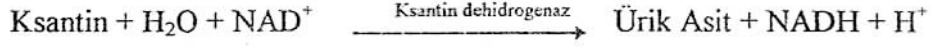
İndirgenmiş flavinler, tioller, divalent metaller, epinefrin ve antibiyotikler gibi çözünebilir hücre komponentleri nötral ortamda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına girerek hücre içi serbest radikal oluşumuna neden olurlar. (77,78).

2- Çözünebilir Hücresel Enzim ve Proteinler:

Çok sayıda enzim katalitik siklusu süresince serbest radikal oluşumuna yol açar. Bu enzimatik kaynaklı serbest radikal oluşumu enzim aktivitesi, kofaktör varlığı, substrat konsantrasyonu ve oksijen basıncına bağımlı olup, hiperoksi, iskemi, antibiyotik tedavisi gibi metabolik durumlarda bazal değerlerin çok üstünde serbest radikal oluşumu gözlenir. Bu enzimlerin başlıca örnekleri ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, aldehid oksidaz, amin oksidaz ve flavin dehidrogenazdır (69,70).

* Ksantin oksidaz: Üzerinde en fazla çalışılmış olan enzim "ksantin oksidaz" enzimi olup bu enzim pH, O₂ ve substrat konsantrasyonuna bağımlı olarak insanda, normal koşullarda, "NAD⁺ bağımlı dehidrogenaz" formunda bulunur ve serbest radikal ara ürünü oluşturmaz. Ancak iskemi gibi metabolik durumlarda veya enzimin invitro proteolitik modifikasyonu sırasında "oksidaz" formuna dönüşür ve süperoksit radikali oluşturur(15,89). İskeminin reperfüzyon döneminde oluşan doku hasarında hipoksantin ve ksantin, ksantin oksidaz ile

ürük aside oksidasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynadığı ilk defa 1985 yılında McCord (86) tarafından gösterilmiştir.



*Siklooksijenaz: Araşidonik asidi metabolize ederek prostoglandin, tromboksan ve prostosiklinler gibi vazoaktif maddelerin oluşumuna yol açar. Siklooksijenaz doymamış bir yağ asidine iki molekül oksijen ilavesiyle prostoglandin G sentezlenmesine neden olur. Prostoglandin G hızla prostoglandin H'ye dönüşür ve bu sırada O_2^{\bullet} ortaya çıkar(69).

Aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz gibi enzimler katalitik sıklusları boyunca süperoksit radikali oluştururlar. Kanemitsu ve arkadaşları(89) bu reaksiyonlar sonunda oluşan radikaller nedeniyle beyinde iskemi oluştuğunu göstermişlerdir.

3- Mitokondrial Elektron Transport Zinciri:

Glukoz ve yağ asitleri gibi zengin enerji bağları içeren moleküller metabolize edilirken bir dizi oksidatif reaksiyon ile CO_2 ve H_2O ya dönüşürler. Bu reaksiyonların ara ürünleri elektronlarını NAD^+ ve FAD^+ gibi özel koenzimlere aktararak bunları indirger ve NADH ve FADH_2 gibi zengin enerjili indirgenmiş koenzimleri oluştururlar. İndirgenmiş olan bu koenzimler elektron çiftlerini, elektron transport zinciri (= respiratuar zincir) olarak adlandırılan özelleşmiş bir dizi elektron taşıyıcı sisteme aktarırlar. Elektron transport zinciri içinde elektron transferi sırasında oluşan enerji, $\text{ADP} + \text{inorganik fosfat (Pi)} \rightarrow \text{ATP}$ sentezi için kullanılırken kalan serbest enerji ısı olarak dışarıya salınır ve $\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ 'ya indirgenir(69). Bu sırada elektron akımının %1 kadarı süperoksit oluşumu ile sonlanır. Ortamda biriken O_2^{\bullet} den bir dizi reaksiyon sonucu H_2O_2 ve $\bullet\text{OH}$ oluşur(15,28).

4-Endoplazmik Retikulum ve Çekirdek Membran Elektron Transport Sistemleri:

Endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında sitokrom P450 ve sitokrom b5 gibi birçok benzer ya da aynı yapıda elementler bulunur ve bunlar doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri oksitleyerek dioksijeni indirgerler(90).

5- Peroksizomal Oksidan Enzimler:

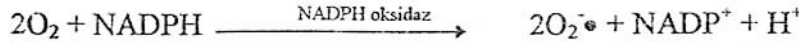
Ara ürün olarak hiç bir zaman süperoksit radikali oluşturmadan doğrudan hidrojen peroksit oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Peroksizomal oksidan enzimlere örnek olarak D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-alfa hidroksi asit oksidaz, yağ-açıl -CoA oksidaz verilebilir.

6- Katekolaminler:

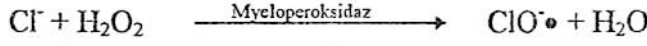
Katekolaminlerin otooksidasyonu özellikle invitro koşullarda potansiyel olarak önemli miktarda serbest radikal üretimi ile sonuçlanmaktadır. İskemik alanda sempatik sinir sonlanmalarından bölgesel norepinefrin ve dopamin β -hidroksilaz salınımı olmakta ve ortamdaki katekolamin monoamin oksidaz (MAO) enziminin katalitik etkisi ile yıkılmaktadır. Bu reaksiyonun içerdiği oksidatif basamakta aşırı elektron salınımı olmakta ve moleküler oksijen bu elektronları alarak peroksit ve hidroksil radikalleri oluşmaktadır(15,17,79,89).

7- Granülosit Aktivasyonu:

Nötrofiller bir diğer potent serbest radikal kaynağıdır. 1978 yılından itibaren granülositlerin iskemi, inflamasyon ve ödem gibi patolojilerde hücre yaralanması ve endotel hasarı üzerine etkileri araştırılmaya başlanmış ve son yıllarda özellikle serebral ve kardiyak iskemi üzerinde yoğunlaşmıştır. Aktive olmuş fagositik hücreler oksijen tüketimini artırırlar, bu "oksidatif patlama" oksijenin hızla süperoksit radikaline indirgenmesine neden olur(67). Bu reaksiyon plazma membranına bağlı NADPH oksidaz enzimi ile katalizlenir ve fazla miktarda hücre dışı ROT üretimine yol açar. Fagositik hücreler tarafından oluşturulan radikaller çevre dokuda da hasarı başlatır ve devam ettirirler.



Oluşan süperoksit radikali ortamda bulunan SOD enzimi ile hidrojen peroksite dönüştürülür. Lökosit yapısında bulunan ve lizozomal bir enzim olan myeloperoksidaz enziminin etkisi ile hidrojen peroksit ve klorid iyonları reaksiyona girerek hipoklorik asidi oluştururlar(15).



8- Vasküler Endotel

Vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO•) üretilmektedir(70). Asetil kolin, substance P, vazopressin ve diğer bazı ajanların stimülasyonu sonrası NO•'nun damar duvarında düz kasları gevşetir(91). Ayrıca NO• sentezi ve salınımı bazal koşullarda serebral damarların bazal tonusu için gereklidir. Bunun içinde NO•'un bazal salınımı gereklidir. NO•'un yarı ömrü 10 saniyedir. Endotel hücrelerinden düz kas hücrelerine diffüze olan NO•, düz kas hücrelerindeki Guanilat siklazı stimüle eder ve siklik Guanosin monofosfat (cGMP) birikimine neden olarak damar düz kaslarında gevşemeye neden olur. NO•, ayrıca serebral damarları innerve eden sinir son uçlarında da sentezlenir ve bir çeşit nörotransmitter olarak görev yapar. Bir başka deyişle NO• metabolizmasında SAK sonrası oluşan değişiklikler serebral vazospazmda rol oynamaktadır(92,93).

9-Transizyon Metalleri

Demir ve bakır; DNA, protein ve lipidlere elektron taşırlar, oksidatif hasarı hızlandırır. Hücre lizisi sonucu hücre içinde ferritin ve hemosiderin şeklinde depolanmış demir ve seruloplazmin gibi yapısında bakır bulunan proteinlerin degradasyonu ile demir ve bakır serbest hale geçer, çevre dokulara salınır ve oksidatif hasarı hızlandırarak katalitik aktivite gösterir(28,94).

D-SERBEST RADİKALLERİN BİYOLOJİK HEDEFLERİ VE TOKSİK ETKİLERİ:

1- Proteinler:

Serbest radikaller aminoasitlerle reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karboksil gruplarının oluşumuna yol açarlar(67). Bu durum protein yapısındaki enzimlerin spesifik aktivitesini ortadan kaldırır(72). Hasar görmüş proteinler ya proteoliz ile ortadan kaldırılır ya da onarılırlar(95).

Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein gibi doymamış ya da sülfür içeren aminoasitler serbest radikaller ile reaksiyona girerek yapısında yer aldıkları proteinlerin modifiye olmasına yol açarlar. Aktivasyonu için bu aminoasitlere gereksinim duyan papain, gliseraldehit-3-fosfat gibi enzimler serbest radikaller veya serbest radikal oluşturan maddelerle karşılaştığı zaman inaktif hale geçerler. Modifikasyona dirençli proteinler de hidroksil radikali gibi çok reaktif radikallerin etkisi ile yapısal değişiklikler gösterebilirler. Proteinlerin serbest radikaller ile reaksiyonu sıklıkla daha potent radikal ara ürünlerin oluşumu ve oluşan yapısal zararın artması ile sonuçlanır. Bu yeni ve daha potent radikaller ortamdaki diğer moleküllerde de yapısal değişikliklere yol açabilir. Proteinlerde serbest radikallerin oluşturduğu toksik etkinin derecesi, proteinin aminoasit kompozisyonuna, aminoasidin protein molekülündeki lokalizasyon ve önemine ve son olarak oluşan değişikliğin tamir edilebilirliğine bağlıdır(72,95).

2- Nükleik Asitler ve DNA:

Nükleotidlerin serbest radikallerle etkileşimi sonucu DNA zincirinde kırılmalar oluşabilir. Ayrıca ROT, peroksitlerle başlayan DNA hasarı sonucu aktive olan polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın onarılması için gerekli NAD ve ATP'nin açığa çıkmasına engel olur. Bu durum hücrenin ATP oluşturmasını baskılar; enerji yetersizliği, kalsiyum dağılımındaki değişiklikler sonucu " hücre ölümü " meydana gelir(67). Ultraviyole ve görülebilir ışık, ısı, gama ve X-ışınları, fotokimyasal irritan maddeler, hiperoksi ve hatta normal biyolojik

metabolizma nükleik asitler ve DNA yapısını etkileyen serbest radikal ve uyarılmış moleküllerin oluşumuna yol açar. Serbest radikal - DNA etkileşimi hücre mutasyonuna ve hücre ölümüne yol açar. Ökaryot ve Prokaryotlarda radyasyon sonucu oluşan hücre ölümünün en önemli nedeni (% 80) hidroksil radikali formasyonudur(69).

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan süperoksit ve peroksit radikalleri doğrudan DNA hasarına yol açmaz ve ancak hidroksil radikali oluşumuna neden olarak DNA'da yapısal değişikliğe neden olurlar(76,96). DNA hasarına yol açan ikinci bir mekanizma da oksidatif stres sonucu hücre içi bir dizi metabolik değişiklik oluşması ve bunların nükleaz enzimlerinin aktivasyonuna yol açarak DNA omurgasında kırılmalara neden olmasıdır.

3- Karbonhidratlar:

Glukoz, mannitol ve deoksi-şekerler hidroksil radikali ile doğrudan reaksiyona girerler. Snovial sıvının viskozitesini devam ettiren ve molekülün merkez eksenini oluşturan proteoglikan, glukronik asit ve N-asetil glukozamin disakkarit ünitelerinin tekrarlandığı glukozaminoglikan (GAG) yapısında olup, bu polimer fraksiyonunun serbest radikallerle karşılaşması polimer yapısının bozularak sinovyal sıvı viskozitesinin kaybına ve dokusunun destabilizasyonuna neden olur(97).

4- Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu:

Plazma membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler, gliserid ve steroller, okside olabilen aminoasit içeren transmembran proteinleri serbest radikal hasarına duyarlıdır. Lipid peroksidasyonu ve yapısal proteinlerin oksidasyonu sonucu artan membran permeabilitesi transmembran iyon geçirgenliğini bozar. Birkaç nedenden ötürü plazma mebranı serbest radikal reaksiyonları için kritik bölgedir:

a) Plazma membranı ekstrasellüler olarak oluşan serbest radikaller için hedef noktadır. Membran yapısında yer alan transmembran proteinleri okside olabilen aminoasitleri içerirler ve bunların serbest radikallerle oksidasyonu sonucunda membran iyon kanalları

bozularak var olan iyon gradienti ortadan kalkar. Yine hücrenin sekretuar fonksiyonu bozulur ve hücrenel metabolik süreçler inhibe olur. Membran yapısında yer alan doymamış yağ asitleri peroksidasyona uğrar (lipid peroksidasyonu).

b) Hidrojen peroksidin hücre membranından geçişi su ile aynı mekanizma ve kolaylıkta olduğu halde, yüklü süperoksit molekülü membranı transmembran anyon kanallarını kullanarak geçebilir.

c) Plazma membranı elektriksel özelliği nedeni ile yeni ve daha toksik radikal oluşumuna neden olur. Polianyonik hücre membranı etrafında kontr-iyon (özellikle H⁺) konsantrasyonu yüksek olup bu membran çevresinde PH'sı komşu dokulara göre yaklaşık iki ile üç birim daha düşük mikroçevre oluşturur. Bu mikroçevre süperoksit radikalının proton alarak kendisinden daha kuvvetli ve penetran olan perhidroksil radikali oluşturmaya neden olur:



d) Mikrozomal ve plazma membranında bulunan lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler substrat olarak araşidonik asiti kullanarak prostoglandinler ve lökotrienler gibi potent ürünler oluştururlar Kuehl. Prostoglandinler ve tromboksanların biyosentezi sırasında biyosentetik enzimlerin kendileri ve diğer hücrenel komponentler ile reaksiyona giren hemoprotein, oksijen ve karbon merkezli serbest radikaller oluşur (15,19,69,89).

E- SERBEST RADİKALLERE KARŞI HÜCRESEL SAVUNMA SİSTEMLERİ

Bu sistemler üç grup altında toplanırlar:

a) Enzimatik olanlar: Örneğin; SOD, Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) gibi.

b) Enzimatik olmayanlar: Örneğin; α-tokoferol (Vitamin E), β-karoten (Vitamin A), Askorbik asit (Vitamin C), Glutasyon (GSH), Melatonin gibi.

c) Ekzojen bileşikler: Örneğin; Mannitol, Desferoksamin, Allopürinol gibi.

Normal düzeyde kaldıkları sürece zararlı etkileri olmadığına göre, serbest oksijen radikalleri ile mücadele oldukça önemlidir. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bu mekanizmalar kısaca *antioksidanlar* olarak bilinirler(98-101) Bu sistemlerin serbest radikaller ile mücadelesi 5 başlıkta toplanabilir.

- 1) Toksik oksidanları oluşum aşamasında durdurmak,
- 2) Oksidanları oluşuktan sonra yoketmek,
- 3) Sekonder oksidanların oluşumuna yol açan zincir reaksiyonları durdurmak,
- 4) Hücrelerin anti oksidan kapasitelerini artırmak,
- 5) Sekonder oluşan toksik metabolitleri ve mediyatörleri yoketmek.

Gutasyon

Glutasyon, sülfidril grubu olan bir tripeptittir. Glutasyon' un çok önemli görevleri vardır. Örneğin; glutasyon kırmızı kan hücrelerini oksidatif zarardan korumaktadır. Glutasyon sentezinin ilk basamağında glutamate' ın δ - karboksil grubu ve sisteinin amino grupları arasında bir peptit bağı oluşmaktadır. Bu reaksiyonu δ glutamilsistein sentetaz katalizlemektedir, peptit bağının oluşması için karboksil grubunun, ATP tarafından aktif hale getirilmesi gerekmektedir. Sonunda aracı açil fosfat meydana gelir. Aracı açil fosfat sisteinin amino grubuna bağlanmaktadır. Bu reaksiyon glutasyon ile feedback inhibisyonu ile inhibe edilmektedir. Glutasyon sentetaz tarafından katalizlenen ikinci basamakta, glisinin amino grubu ile sisteinin bağlanabilmesi için; ATP sisteinin karboksil grubunu aktif hale getirir. Hayvan hücrelerinde yüksek derecede (5mM) bulunan glutasyon sülfidril tamponu olarak görev yapar. İki tripeptit ihtiva eden okside form (GSSG) ve redükte form (GSH) arasındaki döngü bir disülfid bağının bağlanmasıyla olmaktadır. Elektron kaynağı olarak NADPH kullanan bir flavoprotein olan glutasyon redüktaz enzimi tarafından GSSG, GSH' a redüklenmektedir. GSH ile GSSG

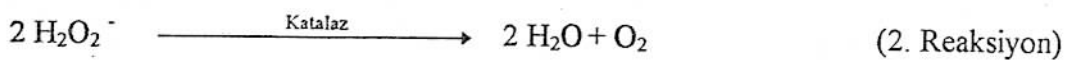
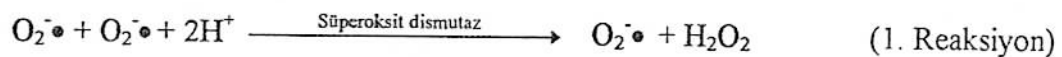
arasındaki oran çoğu hücrelerde 500' den daha büyüktür(102). Glutasyon aerobik metabolizma sonucu oluşan zararlı organik peroksitler ve hidrojen peroksitlerin detoksifikasyon reaksiyonunda büyük bir rol oynar.



F- HÜCRE İÇİ ANTİOKSİDATİF SAVUNMAYI SAĞLAYAN ENZİMLER:

Hücrede bulunan oksijen sitotoksitesine karşı hücreyi koruyan antioksidant enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), ve indirekt olarak glutasyon redüktazı (GSH-R) kapsamaktadır. Koruyucu enzimler olarak bu enzimlerin değişik dokulardaki rolleri çok iyi bilinmektedir. İlk üç enzim peroksitlerin ve süperoksitin toksik olmayan türlere transformasyonunu direkt olarak katalizler. Glutasyon redüktaz, okside glutasyonu (GSSG) glutasyon peroksidaz için substrat olan redükte glutasyon'a (GSH) indirger.

Oksidatif stresin sonucu tehlikelidir ve birçok nedenle oksijen detoksifikasyonundaki çözünen enzimlerin aktivitelerinde artış olmaktadır(103-105). Hücrede oksijen metabolizması sonucunda, superoksit anyonu gibi oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit meydana gelmektedir. Bunların toksik etkileri belki de redoks reaksiyonlarında tek oksijenin ya da, metal iyonları arasındaki geçişimden ve Haber-Weiss olarak adlandırılan reaksiyonlardan ötürüdür. Bu enzimlerin birlikte iş görmelerinin bir kontrol mekanizması altında yürütüldüğü kanısı vardır; örneğin süperoksit dismutaz $\text{O}_2^{\bullet-}$ dismutasyonunu katalizleyerek H_2O_2 üretirken, katalaz ve peroksidazlar H_2O_2 ' yi ortadan kaldırmaktadır(106)



Oksijen türevlerine karşı ikinci bir korunma yolu, oksijene yüksek afinite gösteren ve indirgenmiş oksijenin özel bir şekli olan oksidaz ve oksijenaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir(107). Oksidatif proseslere karşı diğer savunma mekanizmasında, tokoferol ve B- karoten gibi radikal süpürücüleri tarafından oluşturulmaktadır(108).

1) SÜPEROKSİT DİSMUTAZ: (SOD, süperoksit, süperoksit oksidoredüktaz).

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunun H_2O_2 ye ve oksijene dismutasyonunu katalizler. Süperoksit anyonu ve H_2O_2 ' nin temizlenmesiyle yüksek derecede reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunu sınırlamaktadır(109). Mikroorganizmalardan en yüksek yapılı canlılara kadar, aerobik koşullarda yaşayan canlıların bütün doku ve hücre organelleri SOD içerirler(110,111). Süperoksit dismutaz, kesin bir özgülüğe sahip ve $O_2^{\bullet-}$ nin dismutasyonunu (reaksiyon 1) katalizleyen bir metalloenzimdir. Katalitik görevi gören metal, Zn, Cu, Mn veya Fe olabilmektedir(112). Cu' nun rol aldığı enzim en yüksek katalitik etkiyi göstermektedir ve dimer yapıda olup, herbiri bir Cu ve bir Zn iyonu içeren, molekül ağırlığı 16000 olan benzer iki subünitten oluşmaktadır. Cu, Zn süperoksit dismutaz olarak adlandırılır(113). Esas bulunduğu yerler, ökaryotik hücrelerin sitozol'ü ve eritrositleridir. Mn. ihtiva eden enzim mitokondri matriksinde ve prokaryotlarda etkin bir rol oynamaktadır. Katalaz çoğu ökaryotik hücrelerde peroksizomlarda bulunmasına rağmen, süperoksit dismutaz ve peroksidazlar sitoplazmik fraksiyonlarda ve mitokondride bulunurlar. Ayrıca süperoksit dismutaz olarak isimlendirilen iki tip enzim ile temsil edilir(106)

Enzimatik reaksiyonda pH değerlerinin önemli etkileri vardır. Süperoksit dismutaz enziminin $O_2^{\bullet-}$ için olan kuvvetli özgülüğü, metal içeren bölgenin özel yapısından ve enzimin fizyolojik rolü ile ilişkisinden kaynaklanmaktadır.

2) KATALAZ: ($H_2O_2 : H_2O_2$ Oksidoredüktaz.)

Serbest oksijen radikallerini ve serbest radikal türevlerini temizleyen H_2O_2 'yi suya ve moleküler oksijene parçalayan bir enzimdir. Katalaz, bütün memeli hücrelerinde genellikle

karaciğer peroksizomları, böbrek veya beyin mikroperoksizomları ve diğer dokular gibi subselüler organellerin iç kısımlarında bulunur. Tetrametrik yapıya sahip, molekül ağırlığı 240.000 olan, aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" grubu ihtiva eden bir enzimdir. Katalaz süperoksit radikallerinin dismutasyonunu sağladığı ve metabolik olarak peroksitlerin üretimini durdurduğu için çok önemlidir. Serbest oksijen radikalleri kanser olma riskini arttırmakta ve yaşlanmayı hızlandırmaktadır. Katalaz çoğu aerobik organizmalarda bulunmaktadır ve ökaryot dokularındaki mikrobadilerde bulunmaktadırlar. Hidrojen peroksit invivo olarak, normal hücrel metabolizma sonucunda ve oksidant üreten ajanlar (Örneğin primaquine ve divicine) tarafından üretilmektedir. Organizmalar H_2O_2 'nin potansiyel toksisitesinin sonucu olarak indirgenmiş olan reaktif oksijen türleri tarafından çok yönlü olarak zarar görmektedir. Hücrede H_2O_2 enzimatik olarak katalaz tarafından H_2O_2 ve O_2 ye dönüştürülmektedir(107,114).

3) GLUTATYON REDÜKTAZ

Glutasyon redüktaz NADPH' a bağımlı olarak glutasyon disülfiti (GSSG) glutasyon (GSH)' a katalizleyen bir flavoproteindir. İnsanda bulunan glutasyon redüktaz enzimi biri FAD subüniteye sahip olan 52,4-k.Da. subünitesinin bir homodimeridir. Enzimin yapısı ve fonksiyonu çok iyi bilinmektedir(115). Hücredeki etkinliği aşağıdaki tepkimede özetlenmiştir.

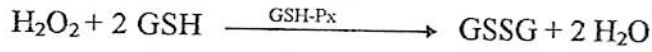


Bu reaksiyon glutasyon seviyesinin muhafazası için önemlidir. Glutasyon oksidasyon ve redüksiyon olaylarında bir redüktant olarak büyük role sahiptir. Aynı zamanda da detoksifikasyonunda ve birçok hücrel fonksiyonda görev almaktadır(116). Glutasyon redüktaz, redükte glutasyon'un regenerasyonunu katalizlemektedir. NADH'dan gelen elektronlar direkt olarak okside glutatyondaki disülfid bağına transfer edilmektedir. NADPH'dan gelen elektronlar, önce flavin adenin dinükleotid'e (FAD) transfer edilirken, sonra glutasyon redüktaz subünitesindeki sisteinde bulunan disülfid bağına ve en sonunda da okside glutatyonu transfer edilirler. Glutasyon redüktazın herbir subünitesi üç yapısal bölgeye sahiptir.

Bu bölgeler bir FAD bağlayan bölge ve NADP⁺ bölgesi birbirlerine ve diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayan bölgelere benzerler(117)

GLUTATYON PEROKSİDAZ

Glutasyon peroksidaz(GSH-Px),hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Molekül ağırlığı 85000 olup tetrametrik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



Glutasyon peroksidaz enziminin selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız iki izomeri vardır. Selenyum bağımlı GSH-Px enziminin aktif merkezinde enzime kovalent bir şekilde bağlı selenositein formunda selenyum bulunmaktadır. Bu enzim substrat olarak hem H₂O₂'yi hem de organik peroksitleri (örneğin kümene hidroperoksit) kullanabilir(118). Buna karşılık selenyum bağımsız formu sadece lipid hidroperoksitlerini (kümene) substrat olarak kullanabilir. Fosfolipid hidroperoksil glutasyon peroksidaz olarak da isimlendirilen enzimin bu formunun molekül ağırlığı 20 000 dalton olup monomerik ve sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikallerin peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller(119-121).

G- SANTRAL SİNİR SİSTEMİ PATOLOJİLERİNDE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİNİN ROLÜ

1) Travmatik Beyin Hasarında Serbest Radikaller

Son yıllarda, serebral iskemi ve kafa travması gibi beyin hasarına neden olan durumlardan sonra gelişen beyin disfonksiyonunda ve beyin hücresi ölümünde serbest oksijen

radikallerinin de rolü olabileceği düşünülmektedir(122). Bu durumlarda serbest oksijen radikalleri endotel hücre hasarına bağlı olarak kan beyin bariyerini bozar veya direkt etki ile beyin ödemine ve nöronlar ile gliyada yapısal değişikliklere neden olurlar(68).

Beyinin ve spinal kordun travmatik nöral hasarları primer ve sekonder mekanizmalarla doku zedelenmesine neden olur. Primer hasar sırasında arterlerin ve venlerin yırtılması, peteşiyal kanamalar ve beyin kontüzyonu ile nöronlarda diffüz hasar meydana gelebilir. Ayrıca epidural, subdural, subaraknoid veya intraserebral hematom gelişebilir. Sekonder hasar; primer olaydan dakikalar, saatler sonra gelişen ve nöral dejenerasyonda başlıca rolü oynayan fizyopatolojik olaylar dizisidir. Global veya fokal serebral iskemi ile sonuçlanır. Sekonder hasar travma ile başlar ve monoaminler, serbest oksijen radikalleri, nöropeptidler, araşidonik asit metabolitleri gibi endojen maddeler ve ekstrasellüler kalsiyum değişiklikleri ile aktive olur(15).

Travmanın yol açtığı bir dizi moleküler olay gittikçe artan vasküler ve nöral dejenerasyona neden olur. Son yıllarda travmatik beyin hasarındaki sekonder veya "otodestruktif" hasar faktörlerini ortadan kaldırmak için bazı farmakolojik ajanlar kullanılmaya başlanmıştır(20). Akut travmatik beyin hasarının primer ve sekonder fazlarında serbest oksijen radikallerinin anahtar rol oynadıkları öne sürülmektedir. Birçok çalışmada akut travmatik beyin ve spinal kord hasarında, serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun oluşan doku hasarının nedeni olduğu gösterilmiştir(123,124)

SSS, SOR'nin neden olduğu doku hasarına birçok faktörlerin etkisi ile daha yatkındır(15). Membran lipidleri, SOR ile kolayca reaksiyona giren kolesterol ve doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Beyinde, koruyucu faktörlerden SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri oldukça sınırlıdır. Kafa travmasında serbest radikallerin oluşumunu tetikleyen demir açısından beyin oldukça zengindir. SSS'in beyaz ve gri cevherinde yüksek konsantrasyonlarda askorbik asit bulunur. Anti-oksidan olan askorbik asit tek başına

yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu, travma ve iskemide kanın ekstrasvazasyonu sonucu açığa çıkan bakır ve demir iyonlarının varlığında fazla miktarda SOR oluşumuna neden olur(15-19). SOR için iyi bir hedef olan lizozomlar nöronlarda oldukça fazla sayıdadır. Bu radikallerin lizozomal membrana etkisi ile lizozomal hidrolitik enzimler nöronun sitoplazmasına salgılanır.

Kontos ve arkadaşları (125) yaptıkları bir seri kafa travması deneylerinde, artmış fosfolipaz C ve araşidonik asit metabolizma ürünleri sonucu serebral arteriyoler hasarın oluştuğunu ve bu hasarın bir siklooksijenaz inhibitörü olan endometazin veya SOD ile önlenebileceğini göstermişlerdir. Önemli bir sonuç da süperoksit oluşumunun kafa travmasından sonra en az bir saat devam ettiği(125-127). Olesan ve arkadaşları (128) ise SGR'nin kurbağa pial venüllerinde elektriksel rezistansı azalttıklarını ve iyonik permeabiliteyi arttırdıklarını, bu durumun SOD ve katalaz ile önlenebileceğini göstermişlerdir.

Travma sonrası ekstrasvaze olan eritrositlerden açığa çıkan hemoglobinden "demir" ve "heme" serbestleşmesi ve açığa çıkan demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşumu lipid peroksidasyonu başlatan en önemli mekanizma olarak kabul edilmektedir. Gerek deferoksamin gibi Fe şelatörü ajanların, gerekse son yıllarda bulunan ve nonglukokortikoid 21-aminosteroid yapısında olan U-74006F'in serebral koruyucu etkilerinin gösterilmesi bu hipotezleri doğrulamaktadır(22,129-131).

Travma sonrası gelişen (vazojenik) beyin ödemi bradikinin, serotonin, histamin, araşidonik asit, lökotrienler gibi kimyasal mediatörler tarafından oluşturulan endotel hücre permeabilitesinin artışına bağlıdır. Bu arada oluşan SOR'i gerek endotel hücre hasarında gerekse nöronal ve glial yapısal değişikliklerde en önemli rolü üstlenmektedir(68). SOR'nin neden olduğu bu vasküler permeabilite artışı aynı zamanda kan beyin bariyerinin bozulmasına ve beyin ödemi oluşmasına yol açar.

Spinal kord ve beyin travmasının akut döneminde erken lipid peroksidasyonu biyokimyasal olarak tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile gösterilebilir(22,74). Spinal kord

ve soğuk beyin hasarında malondialdehid (MDA) oluşumu artar. Her iki travmada da sonuç olarak membran kolesterolü yıkılır; önemli antioksidanlardan olan askorbik asit ve alfa tokoferol gri ve beyaz cevherde hızla tüketilir. Travma sonucunda; Na^+ , K^+ -adenosin trifosfataz pompasının aktivitesinin inhibisyonu da dokudaki lipid peroksidasyonunun erken fonksiyonel sonuçlarından biridir(22,88). Tüm bu bilgiler SOR'nin travmatik beyin hasarında kritik bir rol üstlendiklerini kanıtlamaktadır.

2) İskemik Beyin Hasarında Serbest Radikaller

İskemi sonrası oluşan doku hasarının serbest oksijen radikallerine bağlı olduğunu gösteren araştırmalar her geçen gün artmaktadır(15). Buna karşın serbest radikal oluşumuna neden olan mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu konuda değişik hipotezlerin önceliği değişik araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. 1985 yılında McCord (86) serbest radikallerin ksantin oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyon sonrası oluştuğunu belirtmiş ve bir yıl sonra Kanemitsu ve arkadaşları(89) tarafından yapılan deneysel çalışmada, fokal iskemi alanında ksantin oksidaz yıkım ürünü olan ürik asidin çok yüksek seviyede bulunduğu belirtilerek bu görüş desteklenmiştir(Şekil 1). Buna göre iskemi sırasında mitokondrial oksidatif fosforilasyon kesintiye uğramakta ve hücre ATP seviyesi düşerken AMP seviyesi yükselmektedir. Artan AMP, pürin yıkımına uğramakta ve sırası ile adozin \rightarrow inozin \rightarrow hipoksantin oluşmaktadır. Normal koşullarda hipoksantin ksantin dehidrogenaz enziminin etkisi ile ksantine ve sonuç olarak ürik aside dönüşmektedir. Ancak iskemi ile birlikte intrasellüler Ca^{++} yükselerek hücre içi Ca^{++} -bağımlı proteolitik enzimleri aktive etmektedir. Bu aktivasyon ksantin dehidrogenazın \rightarrow ksantin oksidaza transformasyonuna yol açmakta ve bu enzim nükleotid radikali yerine moleküler oksijeni kullanarak süperoksit radikali oluşumuna neden olmaktadır(65). Süperoksit radikali bir yandan doku harabiyeti oluştururken öte yandan sekonder radikalleri oluşturur. Bunların en önemlisi Fe tarafından katalizlenen Haber-Weiss reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikalidir. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinolün

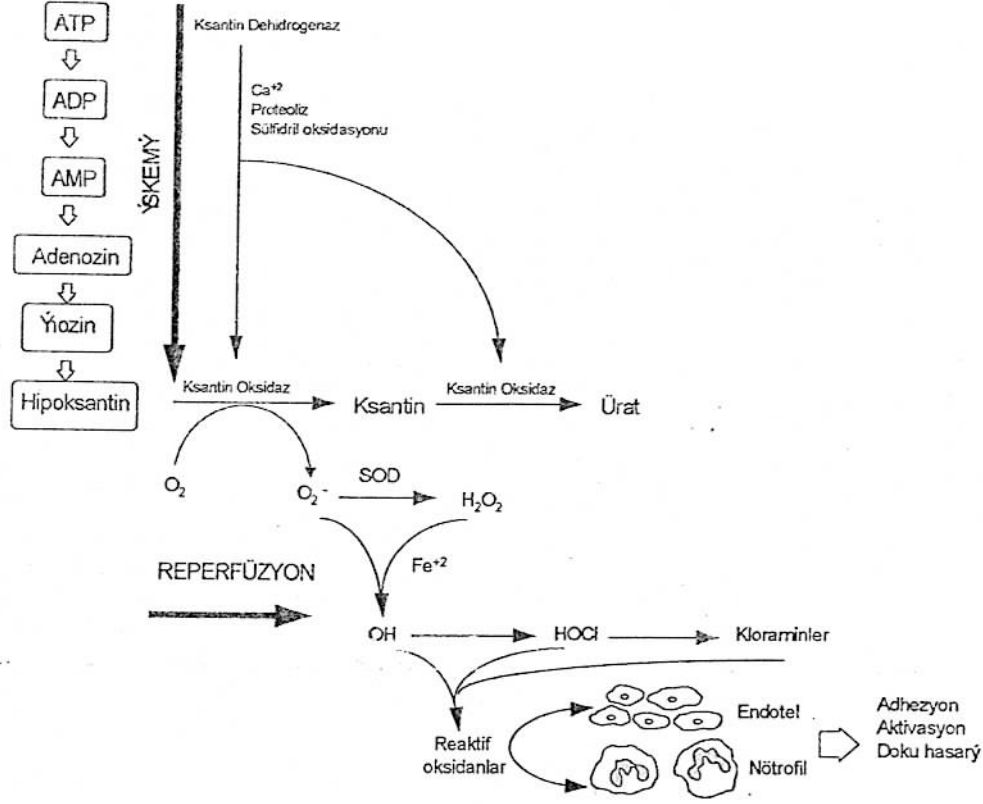
serebral koruyucu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bu hipotezi desteklemiştir(65,132). Yokoyama ve arkadaşları(22,65,133) ile Friedl ve arkadaşları (134) tarafından yapılan çalışmalar iskemi-reperfüzyon hasarında ksantin oksidazın potansiyel bir mediatör olarak rol oynadığını göstermektedir..

Diğer bir hipotez de Fe ile katalizlenen serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu başlatarak, iskemide doku hasarına yol açmasıdır(15,135). Buna göre demir, beyinde çoğunluğu ferritin (depo demiri) ve transferrin (transport demiri) halinde bulunur. Reperfüzyon sırasında süperoksit radikalının etkisi ile ferritinden $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ serbestleşmekte ve bunun katalitik etkisi ile $OH\bullet$ radikalleri oluşarak ilerleyen lipid peroksidasyonla doku harabiyetine yol açmaktadır. Stroke geçiren hastalarda, eritrositlerin yağ asidi kompozisyonunun bozulması lipid peroksidasyona daha hassas nitelik kazanması ile bu hücrelerin lipid peroksidasyon kapasitesinin arttığı Imre ve arkadaşları(22,133,136) tarafından bildirilmiştir.

İskemi sırasında artan hücre içi Ca^{++} un fosfolipaz-A2 enzimini aktive ederek araziidonik asit metabolizmasını aktive ettiği ve karboksijenaz ve lipojenazların etkisi ile prostoglandin ve lökotrienler oluşurken ortaya çıkan SOR'nin, iskemi etyopatogenezinde majör rol oynadığı birçok araştırmacı tarafından benimsenen diğer bir görüştür. Bugüne kadar yapılan çalışmalar bütün bu mekanizmaların birarada ve zamana bağımlı olarak serbest radikal zincirinin oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir.

3) Peri-Tümöral Beyin Ödeminde Serbest Radikaller

Peritümöral beyin ödemi üzerinde yapılan çalışmalarda serotonin, prostoglandin, tromboksan, lökotrien, vasküler permeabilite faktörü ve tümör plazminojen aktivatörü gibi tümör dokusu tarafından üretilen kimyasal maddelerin, ödem ile bir arada bulunan kan-beyin bariyer bozukluğuna yol açtığı, bu arada oluşan serbest radikaller ve yine bizzat tümör dokusu tarafından ortama salınan reaktif oksijen ürünlerinin gerek vasküler



Şekil 1 : İskemi - reperfüzyonla doku hasarının oluş mekanizması.

permeabilite bozukluğuna gerekse doku sitotoksitesine neden oldukları düşünülmektedir(15,19,22,68,89). Radikaller tarafından yönlendirilen karsinogenezis genel mekanizmalar ile olabileceği gibi karsinojene spesifik farklı mekanizmalardan da gelişebilir(65). Son yıllarda serbest radikallerin transkripsiyonu aktive ettiğini, reaktif oksijen ürünlerinin, c-fos, c-myc, c-jun gibi transkripsiyon genlerini (= proto onkogenler) indükleyerek DNA strand kırılmalarına neden olduğunu gösteren bulgular saptanmıştır(22). Transkripsiyon genleri hücre büyümesi, gelişmesi ve başkalaşımında rol alır.

4) Nöro-Dejeneratif Olaylarda Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikallerinin şizofreni, epilepsi, tardiv diskinezi, yaşlanma, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı gibi birçok beyin disfonksiyonunda da rol oynadıkları gösterilmiştir.(22,65,95,123,137).

Santral sinir sisteminde majör eksitatör transmitterlerin nörofarmakolojik etkileri üzerine yapılan son çalışmalarda L-glutamat aminoasitin eksitotoksik etkileri ve yol açtığı nöronal ölüm anlaşılmıştır. Glutamat analogları; kainic asit, ibotenik asit, N-metil-D-aspartatın sistemik verilmesi ile deney hayvanlarında üreme fonksiyonlarında gerileme, davranış defektleri, sinir hücrelerinde dejenerasyon ve ölüm gözlenmiştir. Glutamat analoglarının verilmesi ile gerek yaşlanma, gerekse nörodejenerasyonun biyomarker'larında; biyokimyasal, elektrofizyolojik ve ultrastrüktürel benzer etkiler oluşturulmuştur(138). Yaşlanma süresince SSS' in dejenerasyonu uniform değildir. Eksitatör nörotransmitterler serbest radikallerin oluşumunu artırır(22,88). Sinir terminallerinden salınan bu eksitatör aminoasitler beyin değişik bölgelerindeki dejeneratif süreçleri hızlandırır. Yaş ilerledikçe bu süreç hızlanır. Parkinson ve Alzheimer hastalıkları SOR bağımlı nörodejeneratif olaylardır(22,137).

MELATONİN

1958'de Amerikalı dermatolog Aaron B. Lerner, binlerce sığırın pineal bezinden amfibi denilen, aydınlatıcı faktör olarak da bilinen potent maddeyi tanımladı. Bu N-asetil-5-metoksitriptamin yapısındaki maddeye, amfibi pigmentindeki melanoforları kontrakte ettiği için melatonin adını verdi(139,140).

Memelilerde pineal glandın elektriksel uyarıları hormonal uyarılara dönüştüren bir nöroendokrin transduser olduğu bilinmektedir. Melatonin veya N-asetil-5-metoksitriptamin; 232 moleküler ağırlıklı bir indolamindir.(139)

1) Melatoninin sekresyonu

Melatonin sentezi çevrenin aydınlığına bağımlı olarak gerçekleşir. Bu sentez karanlıkta süperior sempatik gangliondan gelen β -adrenerjik postganglionik sempatik fibriller aracılığı ile stimüle edilir. Aydınlık ise inhibitör etki gösterir. Norepinefrin ve serotonin sempatik terminallerden salınır. Norepinefrin pinealositlerde, hücre membranı içindeki β -adrenerjik reseptörler ve siklik adenosin 3',5'monofosfat (cAMP) yoluyla etkili olurlar. Pinealositte postganglionik fibriller yoluyla β -adrenerjik reseptörlerin stimülasyonu adenil siklazı aktive eder ve cAMP artar. Bu da N-Asetil Triptanini (NAT) artırır; sonuçta ise melatonin sentezi artar. Melatoninin sentezi ve salınımı gece boyunca en yüksek düzeydedir(140).

Smith ve Kappers(140), 1975'de hipotalamusun ventro-medial nükleusunda ve arkuat nükleusta serotonin içeren sinir hücrelerini floresan histokimyasal tekniği ile göstermişlerdir. Pinealektomiye takiben serotonin içeren nöronların bu nükleuslarda azaldığı, pineal ekstraktlarının dışarıdan verilmesiyle düzeldiği gösterilmiştir.

2) Melatoninin metabolizması

Melatonin muhtemelen pineal glandda ve/veya koroid pleksusta depo edilir. Üretimini takiben basit difüzyon ile sekrete edilir. Kan veya BOS'tan hangisine daha çok sekrete edildiği açık değildir. İnsanlarda serum melatonin düzeyi lomber veya ventriküler BOS'tan daha yüksektir. Bu melatoninin primer olarak kan içine sekrete olduğu görüşünü desteklemektedir. Melatonin için efektif bir kan-beyin bariyeri yoktur ve dolaşımdaki melatonin tüm organlar tarafından alınır. Melatoninin %70' i albumine bağlıdır. Gerek bağlı, gerek serbest melatonin kan ile BOS arasında çapraz geçiş halindedir(141). Melatonin intravenöz enjeksiyonu takiben kandan, intra sisternal enjeksiyonu takiben beyinden süratle kaybolur. Başlangıçta yarı ömrü bir kaç dakika iken, bunu daha uzun bir faz izler. Melatoninin çoğu karaciğerde 6-hidroksimelatoninine konjuge olur ve sonradan idrarla atılır. İnsanda da melatonin verilmesini takiben plazma melatonin düzeyi hızla azalır(142). Memelilerde pineal glandda melatonin

sentezi yaşla birlikte azalmaktadır. Puberte ve yaşlı gruplarda pinealositde yapılan histolojik çalışmalarda ve pineal enzimlerinin biyokimyasal analizlerinde bezin melatonin üretme yeteneğinde bir negatiflik gözlenmemiştir(143).

3) Melatoninin etkileri

Pineal bezin endokrin fonksiyonları, üreme sistemi üzerine olan etkileri ve nongonadal endokrin organlar (tiroid, adrenal v.b.) üzerine olan etkileri olarak iki başlıkta incelenebilir. Antigonadotropik etkisi üzerinde çok çalışılmıştır. Pinealektominin juvenil ratlarda prematüre seksüel matürasyona, erişkinlerde ise gonadlarda ve aksesuar organlarda büyümeye yol açtığı bilinmektedir. Bu etki melatonin verilmesiyle bloke edilebilmektedir. Pineal glandın ön hipofiz hormonları prolaktin, LH, FSH sekresyonu üzerine de etkisi vardır(140). Bu konudaki yayınların çoğunluğu melatoninin etkisinin hipotalamus düzeyinde olduğunu, serbestleştirici faktör yapımını etkilediğini savunurken, Reiter melatoninin hipofiz bezini direkt olarak etkileyebileceğini iddia etmiştir(144). Dışarıdan melatonin verilmesiyle lökomotor aktivitenin diğerlerine göre ters etkilendiği, pineal glandın bu aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir. Sosyal izolasyon ve stres pineal glandın morfolojisini ve biyokimyasını etkilemektedir(142). Pineal glandın kış uykusu ve termoregülasyon üzerine de etkili olduğu saptanmıştır(145). Ayrıca pineal gland glukoz ve enerji metabolizmasını, gastrointestinal emilimi, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını, nerve growth faktör ve saç rengini de etkilemektedir(142,145).

Melatonin sağlıklı kimselere verildiğinde uykuyu uyarmakta ve elektroensefalogramda başlıca alfa dalgalarında artış olmakta, hızlı göz hareketleriyle geçen uyku dönemi artmaktadır. Bir kısmında baş ağrısı ve abdominal kramplar da oluşmaktadır. Melatoninin depresyon, şizofreni, Parkinson veya Huntington's koresinde yararlı etkisi yoktur. Bunun yanısıra depresyondaki hastalarda melatonin düzeyi düşük bulunmakla birlikte bu muhtemelen adrenerjik tonustaki azalmaya bağlıdır(142). Klinikte sınırlı sayıda metastatik karsinomlu

hastada interleokin-2 ile birlikte kanser immünoterapisinde melatoninden başarılı sonuç alınmıştır(142).

Glutamat analogları; kainic asit, ibotenik asit, N-metil-D-aspartatın sistemik verilmesi ile deney hayvanlarında üreme fonksiyonlarında gerileme, davranış defektleri, sinir hücrelerinde dejenerasyon ve ölüm gözlenmiştir. Glutamat analoglarının verilmesi ile gerek yaşlanma, gerekse nörodejenerasyonun biyomarkerlarında; biyokimyasal, elektrofizyolojik ve ultrastrüktürel benzer etkiler oluşturulmuştur. Melatonin ve eksitator aminoasitler olgunlaşmada ve yaşlanmada birbirinin tersi etkilere sahiptir.(138,146).

Melatonin en ilkelinden en gelişmişine kadar bütün aerobik organizmalarda bulunan, evrim boyunca korunmuş bir moleküldür(25,28,147). Melatonin çok yüksek derecede lipofilik bir ajandır. Buna karşın sanıldığı gibi hidrofobik değildir. Sudaki çözünürlüğü 5×10^{-3} M olarak tespit edilmiştir(148). Melatonin bu özelliği sayesinde kan-beyin bariyeri, kan-BOS bariyeri gibi bütün morfo-fizyolojik bariyerleri kolayca geçer ve tüm subselüler kompartmanlara süratle diffüze olur. Melatonin potent bir serbest radikal tutucudur ve bu özelliğinden dolayı yaşa bağımlı dejeneratif olayları engellemekte yararlı olabileceği düşünülmektedir(28,147,149,150).

Tan (26) ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada serbest radikaller aracılığı ile DNA üzerinde oluşturulan hasarın, Chen (27) ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise in vitro olarak retinal lipid peroksidasyonunu doz bağımlı olarak engellendiği göstermişlerdir.

Melatonin, iyi bilinen bir diğer serbest radikal tutucu olan glutatyondan (bilinen en potent endojen serbest radikal tutucu) 5 kez, mannitolden ise (bilinen en potent eksojen serbest radikal tutucu) 14 kez daha efektiftir. Bu özelliği in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir(26).

Melatoninin insanlara beş yılı aşkın süreyle ve 300 mg/gün üzerinde dozlarda verilmesine rağmen yan etki görülmemiştir(151).

MATERYAL VE METOD

I- MATERYAL

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Deneyde, ağırlıkları 2,8-3,5 kg arasında değişen Yeni Zellanda ırkından tavşanlar kullanıldı. Alınan doku örneklerinden antioksidan enzimler Moleküler Biyoloji laboratuvarında çalışıldı. Yapılan cerrahi işlemler ve dekapitasyon sırasında mikroskop ve mikrosürüj aletlerinden yararlanıldı.

II- METOD

A) DENEY GRUPLARI

1. Grup (Kontrol Grubu, K): Oluşturulan SAK modelinin sonuçlarını mukayese etmek amacı ile oluşturuldu. 8 hayvanın Sisterna Magna'sına ponksiyon ile 2,5 cc %0.9 NaCl verildi. Denekler 72 saat sonra aynı yöntemle perfüze edilerek doku örnekleri alındı.

2. Grup (SAK Grubu): Anestezi altında deneklerin posterior sirkülasyonlarına, aşağıda tarif edilen yöntemle 1. grupta olduğu gibi SAK oluşturuldu. Denekler 72. saat ve 10. gün olarak iki alt gruba ayrıldı. Belirlenen süre sonunda denekler sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı.

3. Grup (SAK+MEL Grubu): Anestezi altında deneklerin posterior sirkülasyonlarına, aşağıda tarif edilen yöntemle 1. ve 2. grupta olduğu gibi SAK oluşturuldu. Denekler 72. saat ve 10. gün olarak iki alt gruba ayrıldı. Bu gruptaki deneklere intraperitoneal melatonin uygulandı. Belirlenen süre sonunda denekler sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı.

B) SUBARAKNOİD KANAMA OLUŞTURULMASI

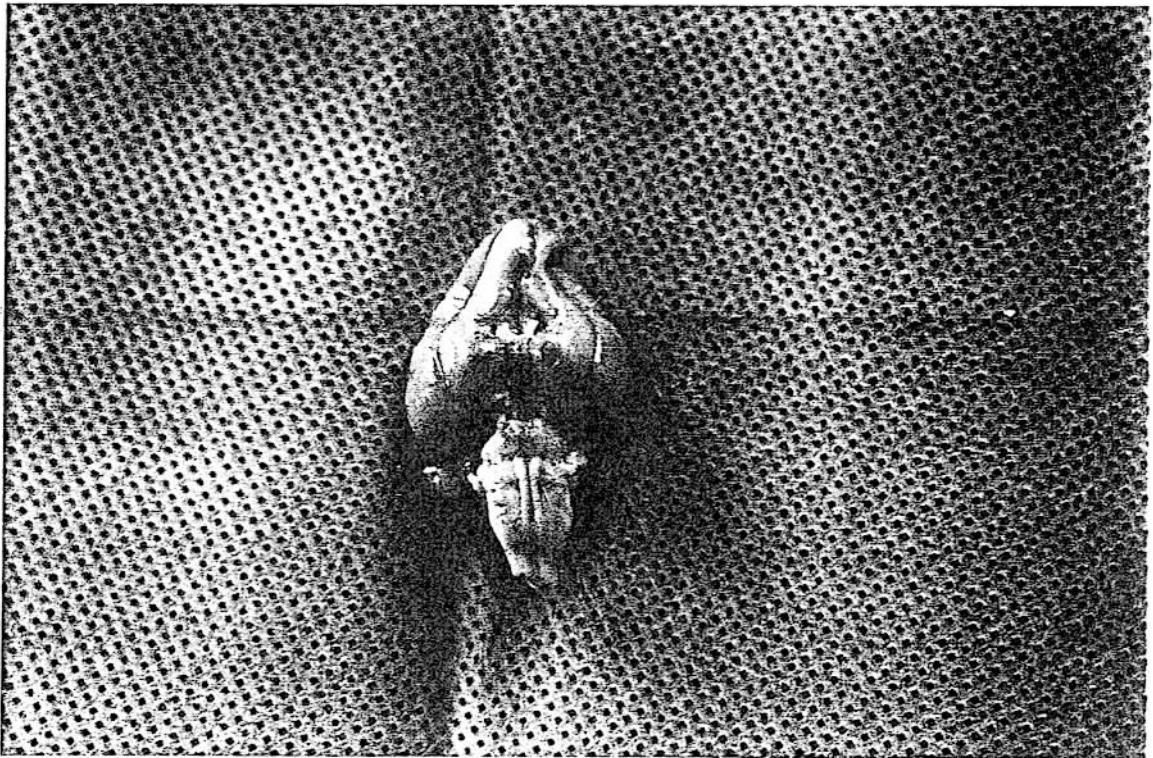
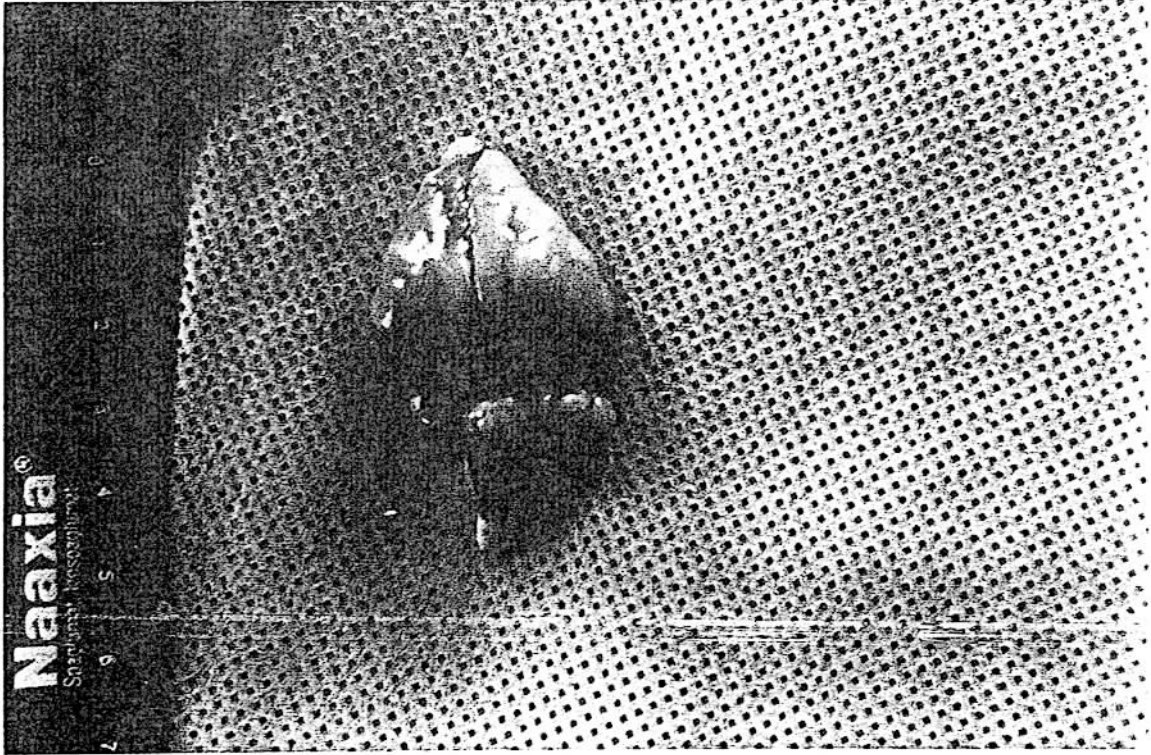
1) Anestezi: Çalışmada kullanılan tüm hayvanlar Ketamin (Ketalar %5'lük solüsyon, Parke-Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç Sanayii, İstanbul.) - 50 mg/kg - ve Rompun (Xylazine %2'lik solüsyon, Bayer, İstanbul.) - 8 mg/kg - intramuskuler enjeksiyon ile uyutuldu. Çalışma süresince hayvanlar kendi solunumlarına bırakıldı.

2) SAK oluşturulması: Bu çalışmada 1992 yılında Johshita, Kassell ve ark.(152) tarafından tavşanlarda sisterna magna içine otolog kan enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel SAK modeli standart yöntem olarak kullanıldı. 23 G kelebek set ile perkütan yolla sisterna magna'ya enjeksiyon yapıldı. Berrak BOS geldiği görüldü. Kulak veninden alınan non heparinize 2,5 cc otolog kan aynı yolla verilerek posterior sirkülasyonda subaraknoid kanama oluşturuldu (Resim 1). Denekler SAK ve SAK+MEL gruplarına ayrıldı. Subaraknoid kanama oluşturulurken, kanın Sisterna Magna'ya verilmesi sırasında hayvanlarda 15-30 saniye süreli solunum arresti geliştiği ve spontan olarak düzeldiği gözlemlendi. 5 hayvan sisternal kan enjeksiyonunu takiben kaybedildi.

3) Perfüzyon ve doku örneklerinin alınması: Belirlenen zaman dilimi sonrasında hayvanlar tekrar aynı yöntem ile uyutuldu. 1000 cc %0.9 luk NaCl sol ventrikülden aorta ileletilen katater yolu ile ve 100 mmHg basınçla verilerek hayvanlar perfüze edildi. Skalp açılarak kalvaryum ortaya konuldu, beyin ve beyin sapı bir bütün olarak çıkarıldı. Serebellum ve beyin sapından ayrı ayrı doku örnekleri alınarak sıvı azot içinde donduruldu.

C- MELATONİN UYGULANMASI

Melatonin (%10 etanol içinde) 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. SAK+MEL grubundaki hayvanlara subaraknoid kanama oluşturulduktan sonra; 15. dakikada, 24. saatte, 48. saatte ve 72. saatte 10 mg/kg intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra 10. güne kadar 5mg/kg/gün intraperitoneal (ip) melatonine devam edildi.



Resim 1A ve B : İntrasisternal otolog kan enjeksiyonu ile oluşturulan subaraknoid kanama. Beyin dokusunun dorsal ve ventral yüzeyinin görüntüsü

D- HOMOJENİZASYON VE SANTRİFÜJ İŞLEMİ

Tartılan beyin dokusu, 1/5 w/v oranında PBS tamponu (pH 7.4) eklenerek yine buz izolasyonu altında PCV, Kinematica, Status homojenizatörü ile tüm doku parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, VWR Branson Scientific sonifikatörde 30 saniyelik aralıklarla 3 defa 30 saniye süreli sonifiye edilerek özellikle peroksizom membranının parçalanması neticesinde bu organelde lokalize olan CAT enziminin açığa çıkarılması sağlanmıştır. Homojenizasyon ve sonifiye işlemlerinin ardından 17.000 rpm' de, +5°C' de 15 dakika Ole Dich 157.MP mikrosantrifüj aletiyle santrifüj işlemi ile tüm enzim aktiviteleri ve protein tayininin yapılacağı süpernatant elde edildi. Süpernatant örnekleri, enzim aktivite ve protein tayinleri yapıncaya kadar derin dondurucuda -40°C' de saklandı.

E- PROTEİN TAYİN YÖNTEMİ

Beyin dokusundan elde edilen süpernatantlardan enzim aktivite tayinleri yapılmadan önce 1 ml süpernatandaki enzim miktarı tayini için Lowry yöntemi uygulandı(153). Bu yöntem için çözeltiler ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir.

1. A Karışımın hazırlanması:

2 % Na₂CO₃ (0.1 N Na₂OH içerisinde) 100 hacim (100 ml).

2% Na, K. Tartarat -----1 hacim (1ml).

1 % Cu₂CO₄-----1 hacim (1ml).

2. B Karışımın hazırlanması:

Folin Fenol Belirteci-----1 hacim

Bidistile su-----1 hacim

3. BSA Çözeltisi:

Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltiden örneklerin çalışma aralığına göre 10,20,30,40,50,.. µg/mL' lik çözeltileri hazırlandı.

Protein tayin işlemi ise aşağıda belirtilen sıraya göre yapıldı:

1. Her deney için 2 kör ve örneğin çalışma aralığına bağlı olarak değişik konsantrasyonlarda BSA' lar ve numuneler için ayrı tüpler kullanıldı ve her tüpe A çözltisinden 2.5 mL eklendi.

2. 1,345 mg/mL BSA stok çözeltisinden kör tüpler hariç, sırasıyla 1. tüpe 10µL, 2.tüpe 30 µL tüpün duvarlarına mikropipet yardımı ile damla damla bırakıldı.

3. Diğer tüplere ise 2 ve 4 µL süpernatant tüpün duvarlarına damla damla bırakıldı.

4. Tüpler iki defa vortex ile karıştırıldı. 10 dakika beklenildi.

5. 10 Dakikalık bekleme süresi içerisinde 1:1 oranında(v/v) distile su ile sulandırılan folin ayıracı hazırlandı. Kör tüp dahil her tüpe 50 µL folin ayıracı eklenildi. Tüpler ikişer kez karıştırıldı ve 45 dakika karanlıkta bekletildi.

6. Spektrofotometrede (Philips. Pu. 8715. UV/VIS) 695 nm de absorbans okundu.

BSA (Sığır serum albumin proteini) standart olarak kullanıldı.

F-ENZİM AKTİVİTELERİ TAYİNİ

Bu çalışmada SAK, SAK+MEL ve K grubu deneklerin beyin sapı ve serebellar doku homogenizatlarında günlere bağlı olarak (72. saat ve 10. gün) SOD, Katalaz, Glutatyon redüktaz, Glutatyon peroksidaz aktivitesi değerleri tayin edilmiştir.

1) Katalaz Aktivitesinin Ölçümü:

Katalaz aktivite ölçümü H. Luck' un (154) yöntemine bağlı kalınarak yapılmıştır.

1. pH = 7 de 1/15 M' lik KH₂PO₄ ile hazırlanan tampon çözeltiden 100 mL alınarak, üzerine 160 µL H₂O₂ ilave edilerek A karışımı hazırlanmıştır.

2. Hazırlanan bu A karışımından 1000 μL alınıp, spektrofotometre tüpüne konulmuştur. Bu karışım önce iki kez kör olarak okunmuş olup, spektrofotometrinin sıfır ayarı yapılmıştır.

3. 1 mL lik kuars spektrofotometre tüplerine 1000 μL A karışımı konulmuş, paralel olarak iki tüp üzerine birine 5 μL , diğerine 100 μL süpernatan eklenip, bir kez karıştırılarak, derhal 1 dakikadaki optik dansite değişimi okunmuştur.

4. Okuma işlemi 240 nm de yapılmıştır.(154)

Katalaz enzim aktiviteleri:

Okunan bu optik dansite farkından mL' deki enzim ünite sayısı aşağıdaki formül gereği hesaplandı.

$$C = \frac{\Delta oD \times 1 \text{ dk} \times 1000}{0,36 \times \mu\text{L süpernatan}}$$

Okunan bu optik dansite farkından mL' deki enzim ünite sayısı yukarıdaki formül gereği hesaplanmıştır. Ünit aktivite değerleri Lowry metodu ile elde edilen mg/mL total protein miktarına bölünerek, katalaz için $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein değerleri bulunmuştur. Katalaz aktivitesinin bir ünitesi, dakikadaki 1 μmol H_2O_2 ' nin redüksiyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2) Glutasyon Redüktaz Aktivite Tayini:

Glutasyon Redüktaz aktivitesi için gerekli çözeltiler:

0,2 M K_2HPO_4 - KH_2PO_4 tamponu (2mM EDTA içinde) pH: 7.0

2mM NADPH/Tris HCl pH: 7:0 (Taze hazırlanmış)

20 mM GSSG

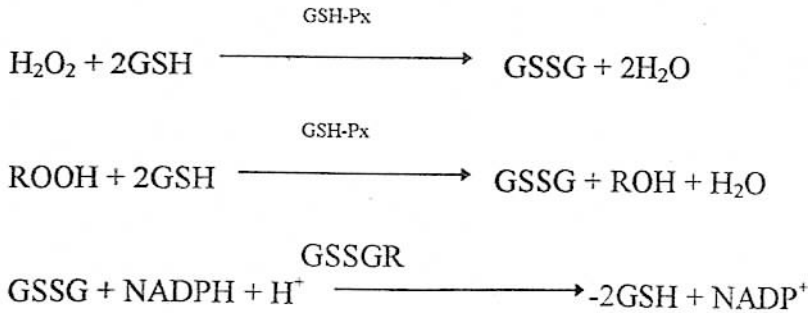
30°C de inkübe edilen potasyum fosfat tamponundan 0.5 mL alınıp, 1 ml' lik spektrofotometre tüpüne konuldu. Üzerine 50 µL GSSG ve 1 ml' ye tamamlanacak şekilde, yani 0,4 mL distile su ilave edildi. Bu tüp önce kör tüp olarak okundu, sonra bu karışım üzerine de 50 µL süpernatant ve kontrol olarak ikinci bir karışım üzerine de 100µL süpernatant ilave edilerek 340 nm de 1 dakikalık OD değişimi okundu. Glutasyon redüktaz aktivitesinin bir ünitesi, dakikadaki 1 µmol NADPH' ın redüksiyonunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. (116).

Spektrofotometrede okunan absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak ünit aktivite tayin edilmiştir. Bu değer mg/ml total Proteine bölünerek glutasyon redüktaz için µmol/mg total protein değerleri bulunmuştur.

$$C = \frac{OD \cdot X \text{ Toplam Hacim(ml)} \cdot X100}{6,22 \cdot X \text{ µL süpernatant}}$$

3) Se-Bağımlı ve Se-Bağımsız Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması:

Se-bağımlı ve Se-bağımsız olmak üzere iki izomeri bulunan GSH-Px enziminin rol aldığı tepkimeler aşağıdaki gibi olup, aktivite tayini için Lawrence R.A.; ve Burk R.F. yöntemi uygulanmıştır (155).



Gerekli Çözeltiler:

Tampon Çözelti : 50mM KH_2PO_4 + K_2HPO_4 + 5mM EDTA içeren çözelti

olarak kullanılmıştır. pH:7

NaN_3 (Sodyum azid) : 1 mM

GSH (redükte glutatyon) : 2 mM

H_2O_2 : 0.25 mM

NADPH : 0.2 mM

GSSG Redüktaz : 1.2 U/mL

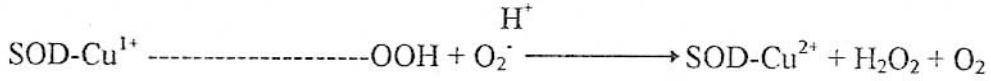
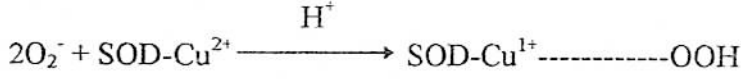
Belirtilen derişimlerde hazırlanan çözeltilerle önce kör ardından da örnek deneyleri yapılmıştır. Bunun için 1 mL tampon, 10 μL NADPH, 10 μL GSH, 10 μL NaN_3 ve 2 μL GSSG Redüktaz çözeltileri spektrofotometre küvetine kondu. 37°C de 5 dk süre ile inkübasyona tabi tutulan çözelti karışımına Se-bağımlı GSH-Px aktivite tayininde H_2O_2 ; Se-bağımsız GSH-Px ölçümlerinde ise Kümene hidroperoksit ilave edilerek ve bir kez karıştırdıktan sonra kör deneme için Philips PU. 8715 UV/VIS spektrofotometrede 340 nm deki absorbans değişimi (1 dk.) gözlemlendi. Numune deneyleri için ise H_2O_2 ve Kümene hidroperoksit eklendikten sonra belirli miktarlarda süpernatant ilave edilerek kör denemeleri için yapılan işlemlerde olduğu gibi 340 nm deki absorbans değişimi okunarak enzim aktivite tayini şu formülde hesaplandı:

$$C = \frac{\Delta\text{OD}}{6220/\text{mL}} \quad \Delta\text{OD: Optik Dansite Farkı}$$

4) Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini ve Hesaplanması:

Hücrel antioksidatif savunma mekanizmasının en önemli olan SOD, süperoksit radikallerinin dismutasyonunda görev almaktadır. Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c'yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline

dayanan enzim aktivite deneyi McCord J.M; Fridovich 1 yöntemine (64) göre yapılmış olup, detaylar aşağıdaki gibidir.



Cerikli Çözeltiler:

A Çözeltisi: 0,76 mg (5 µmol) ksantin'in 10 mL 0.001 N NaOH' daki çözeltisi ve 24.8 mg (2 µmol) sitokrom c' nin 100 mL 50mM pH 7.8 ve 0.1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırılır. Bu çözelti, +4°C de 3 gün kararlıdır.

B Çözeltisi: Taze hazırlanan ksantin oksidazın 0.1 mM EDTA' daki çözeltisi 0.2 U/mL.

- 1) 3mL' lik spektrofotometre küvetine 2.9 mL A çözeltisi eklendi.
- 2) Daha sonra 50 µL örnek ilave edildi.
- 3) Tepkime 50 µL B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı.
- 4) Hızlı bir şekilde, Philips PU.8715 UV/VIS spektrofotometrede 550 nm deki absorbans değişimi okundu.
- 5) Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 µL bidistile su eklendi.
- 6) Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyondaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltisinin 5 µL, 10 µL ve 15 µL deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem için saf SOD enzimine ihtiyaç vardır. Sonuçta % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\Delta\text{OD (Örnek)}}{\Delta\text{OD (Kör)}} \times 100$$

H- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada veriler SPSS for Window 6.1 istatistik paket programına girilmiş ve tanımlayıcı istatistikler yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerden aritmetik ortalama değeri elde edilerek tüm tablolarda standart hata ile birlikte gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda örnek sayısı 20 den az olduğu için non-parametrik testlerden Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edilerek istatistiksel yorumlar yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada elde edilen sonuçlar, beyin sapı ve serebellum dokusunda olmak üzere, ayrı ayrı çalışılmış olup elde edilen SOD, Katalaz, Glutasyon Redüktaz, Glutasyon Peroksidaz (Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız) enzim aktiviteleri ve sonuçlar özetlenerek Tablo 1'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 1 : Enzim Sonuçlarının Toplu Dağılımı

	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
GSH-R Beyinsapı	1,19±0,11	0,51±0,11	0,92±0,09	0,39±0,12	0,84±0,07
GSH-R Serebellum	0,53±0,43	0,49±0,16	0,683±0,07	0,590±0,23	0,67±0,06
KATALAZ Beyinsapı	57,24±5,6	43,30±4,46	90,61±8,93	80,55±9,94	61,74±7,84
KATALAZ Serebellum	50,95±10,66	39,53±5,71	79,8±8,45	69,92±5,98	47,51±5,39
SOD Beyinsapı	205,63±14,19	155,06±25,57	188,59±13,11	107,6±10,77	162,56±16,01
SOD Serebellum	144,69±10,15	91,88±3,79	138,77±7,7	121,34±14,71	110,93±12,40
GSH-Px (Sel+) Beyinsapı	1,66±0,39	2,1±0,36	1,95±0,17	1,99±0,37	1,07±0,21
GSH-Px (Sel+) Serebellum	2,34±1,23	1,98±0,43	2,22±0,2	2,0±0,31	1,29±0,14
GSH-Px (Sel-) Beyinsapı	2,4±0,19	2,13±0,3	1,89±0,19	1,11±0,22	1,55±0,36
GSH-Px (Sel-) Serebellum	1,58±0,11	1,76±0,32	1,84±0,39	1,39±0,31	2,24±0,26

SAK3: Subaraknoid kanama oluşturulup 3. günde sakrifiye edilen vakalar.

SAK10: Subaraknoid kanama oluşturulup 10. günde sakrifiye edilen vakalar.

SM3: Subaraknoid kanama oluşturulup 15. dakika ve 2. gün melatonin verildikten sonra 3. günde sakrifiye edilen vakalar.

SM10: Subaraknoid kanama oluşturulup 15. dakika ve daha sonra 1-9. günler arasında hergün melatonin verilen ve 10. günde sakrifiye edilen vakalar.

KONTROL: Subaraknoid mesafeye serum fizyolojik verilen vakalar.

GSH-R: Glutasyon redüktaz değerleri.

KATALAZ: Katalaz değerleri.

SOD: Süperoksit dismutaz değerleri.

GSH-Px (Sel+): Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz değerleri.

GSH-Px (Sel-): Selenyum bağımsız glutasyon peroksidaz değerleri.

1) **SOD Değerleri :** Beyin sapı SAK 3. gün SOD aktivitesi değerleri $265,71 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $150,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $205,63 \pm 14,19$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SAK 10. gün SOD aktivitesi değerleri $264,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $78,57 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $155,06 \pm 25,57$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 3. gün SOD aktivitesi değerleri $160,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $264,28 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $188,59 \pm 13,11$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 10. gün SOD aktivitesi değerleri $58,46 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $137,50 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $107,60 \pm 10,77$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 3. gün SOD aktivitesi değerleri $104,80 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $185,71 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $144,69 \pm 10,15$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 10. gün SOD aktivitesi değerleri $74,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $106,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $91,88 \pm 3,79$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 3. gün SOD aktivitesi değerleri $117,00 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile $185,71 \mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $138,77 \pm 7,7$

olarak hesaplandı. Serebellum SM 10. gün SOD aktivitesi değerleri 58,40 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 168,42 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 121,34 \pm 14,71 olarak hesaplandı.

SAK 3. gün ve SM 3.gün gruplarında beyin sapı SOD aktivitesi yüksek bulunmuştur. SAK 10.gün ve SM 10 gün gruplarında değerler kontrol grubuna göre düşüktür. Beyinsapı SOD aktivitesi SM 10. gün grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Serebellumda ise SM-10 grubunda anlamlı şekilde yüksektir. ($P < 0,05$)

2) **Katalaz:** Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin sapı SAK 3. gün katalaz aktivitesi değerleri 35,00 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 78,27 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 57,24 \pm 5,26 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin sapı SAK 10. gün katalaz aktivitesi değerleri 25,00 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 63,42 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 43,30 \pm 4,46 olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 3. gün katalaz aktivitesi değerleri 46,27 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 126,00 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 90,61 \pm 8,93 olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 10. gün katalaz aktivitesi değerleri 55,50 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 128,43 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 80,55 \pm 9,94 olarak hesaplandı. Serebellum SAK 3. gün katalaz aktivitesi değerleri 12,60 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 103,00 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 50,95 \pm 10,66 olarak hesaplandı. Serebellum SAK 10. gün katalaz aktivitesi değerleri 25,45 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 67,42 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 39,53 \pm 5,71 olarak hesaplandı. Serebellum SM 3. gün katalaz aktivitesi değerleri 57,69 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 123,00 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer 79,80 \pm 8,45 olarak hesaplandı. Serebellum

SM 10. gün katalaz aktivitesi değerleri 50,23 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 92,21 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $69,92 \pm 5,98$ olarak hesaplandı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, beyin sapı katalaz aktivitesi SAK3. gün ve SAK 10.gün gruplarında hafif olarak düşük izlenmektedir. SM 3.gün ve SM 10.gün gruplarında katalaz aktivitesi yüksektir. SM 3. gün grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. ($P < 0,05$). Serebellar doku katalaz aktiviteleri beyinsapı değerleri ile paralellik göstermektedir. Hem SM-3 hemde SM-10 grubu katalaz aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

3) GSH-R: Beyin sapı SAK 3. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,73 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 1,65 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,19 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SAK 10. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,06 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 0,85 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,51 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 3. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,57 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 1,40 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,92 \pm 0,09$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 10. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,03 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 0,96 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,39 \pm 0,12$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 3. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,37 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 0,75 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,53 \pm 0,43$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 10. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,14 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 1,44 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,49 \pm 0,16$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 3. gün GSH-R aktivitesi değerleri 0,45 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein ile 0,96 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,68 \pm 0,07$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 10. gün GSH-R aktivitesi

değerleri 0,05 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 1,84 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $0,59 \pm 0,23$ olarak hesaplandı.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında beyin sapı GSH-R aktivitesi; SAK 3. gün ve SM 3. gün gruplarında hafif olarak yüksektir. SAK 10. gün ve SM 10. gün gruplarında anlamlı derecede düşüktür ($P < 0,05$). Serebellar dokuda ise SM 3. gün grubu değerleri kontrol grubu ile aynıdır. SAK 3. gün, SAK 10. gün ve SM 10. gün grubu değerleri kontrol grubuna göre düşüktür. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($P > 0,05$)

4) GSH-Px (Selenyum bağımlı): Beyin sapı SAK 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 0,48 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 3,93 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,66 \pm 0,39$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SAK 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 0,87 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 3,72 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,1 \pm 0,36$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 1,07 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,72 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,95 \pm 0,17$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 0,93 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 4,15 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,99 \pm 0,37$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 1,13 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 4,66 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,34 \pm 1,23$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 0,75 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 4,22 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,98 \pm 0,43$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı)

aktivitesi değerleri 1,32 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,89 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,22 \pm 0,2$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımlı) aktivitesi değerleri 0,89 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,89 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,0 \pm 0,31$ olarak hesaplandı.

Bütün gruplarda beyin sapı GSH-Px (Selenyum bağımlı) enzim aktivite değerleri yüksektir. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında SAK 10. gün ve SM 3. gün gruplarında değerler anlamlı olarak yüksektir ($P < 0,05$). Serebellar dokuda ise benzer şekilde bütün gruplarda aktiviteler yüksektir. İstatistiksel değerlendirme sonucu SAK 3. gün ve SM 3. gün grubu değerleri anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$).

5) GSH-Px (Selenyum bağımsız): Beyin sapı SAK 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 1,56 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 3,07 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,04 \pm 0,19$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SAK 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 1,14 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 3,76 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $2,13 \pm 0,3$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 1,01 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,69 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,89 \pm 0,19$ olarak hesaplandı. Beyin sapı SM 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 0,46 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,34 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,11 \pm 0,22$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 1,16 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 2,10 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,58 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Serebellum SAK 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri 0,86 $\mu\text{mol/mg}$ total protein ile 3,47 $\mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu.

Ortalama değer $1,76 \pm 2,32$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 3. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri $0,53 \mu\text{mol/mg}$ total protein ile $3,40 \mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,84 \pm 0,39$ olarak hesaplandı. Serebellum SM 10. gün GSH-Px (Selenyum bağımsız) aktivitesi değerleri $0,53 \mu\text{mol/mg}$ total protein ile $3,07 \mu\text{mol/mg}$ total protein arasında değişiyordu. Ortalama değer $1,39 \pm 0,31$ olarak hesaplandı.

SAK 3. gün, SAK 10. gün ve SM 3. gün gruplarındaki GSH-Px (selenyum bağımsız) enzim aktiviteleri yüksek, SM 10. gün grubu değerleri düşüktür. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($P > 0,05$). Serebellar doku GSH-Px (selenyum bağımsız) enzim aktiviteleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre düşüktür. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($P > 0,05$)

TARTIŞMA

İlk defa 1965 yılında Francis Echilin (8) tarafından deneysel SAK modeli geliştirilerek bazilar ve vertebral arterlerde vazospazm oluşturulmuştur. Bu modelde maymunlar kullanılmış ve anterior servikal yolla mandibula kesilerek iki yönde retrakte edilmiş, böylece kafa kaidesi ve Foramen Magnum'un ön kenarına ulaşılarak bu bölgeye geniş kraniektomi yapılmıştır. Dura açıldıktan sonra bazilar ve vertebral arterlerde mekanik uyarım, elektriksel stimülasyon ve kan irrigasyon sonucu cevaplar incelenmiştir.

1970 yılında Bryce Weir ve arkadaşları(12) tarafından yine maymunlar üzerinde yapılan çalışmada, bu kez nazion üzerinde açılan burr-hole'den yerleştirilen 19G iğne, anterior fossa tabanında ilerletilerek tüberkulum sella'nın hemen önüne kontrollu olarak yerleştirilmiş ve bu bölgeye tekrarlanan kan enjeksiyonları ile vazospazm oluşturulmuştur.

1970'li yıllarda uygulanan deneysel SAK modellerinde maymun, domuz, köpek gibi büyük hayvanların kullanıldığı ve genellikle kraniotomi veya kraniektomi ile anterior yada posterior sirkülasyonda yer alan büyük damarlar çevresinde subaraknoid kanama oluşturulduğu görülmektedir. Bu bölgede yer alan damarlar çerçevesine başka bir arterden alınan otolog kan bırakılabildiği gibi doğrudan damar duvarına ponksiyon yapılarak yada duvarı yırtılarak SAK oluşturulabildiği gözlenmektedir.

1979 yılında Kevin Barry ve ark.(156) tarafından yapılan çalışmada o güne kadar kullanılan köpek, kedi, domuz gibi nispeten pahalı ve temini güç hayvanların yerine ratların kullanılması önerilmiştir. Bu çalışmada anterior servikal yoldan klivusa ulaşılarak mikroskop ve elmas uçlu drill yardımı ile bazilar arter eksplore edilmiş ve 40-60 μ çapında tungsten elektrod ile dura ve araknoid membranların bütünlüğü bozulmadan bazilar arter perfore edilerek SAK

oluşturulmuştur. Yeterli subaraknoid kanama olduğu mikroskop altında kontrol edildikten sonra işlem sonlandırılmıştır. Bu çalışmanın en önemli özelliği subaraknoid kanın rezolüsyonunun işlemden 8 gün sonrasına kadar periodik olarak incelenmesi ve mikroskopik ve fotografik olarak dökümanite edilmesidir. Sonuç olarak rat SAK modelinde, belirgin, kronik serebral vazospazmın 2. günde geliştiği, 3 günde vazospazmın gerileyerek bazılar arter çapının başlangıç değerlerine döndüğü, 4 ila 5.günlerde ise bazılar arterde orta derecede bir vazodilatasyonun geliştiği saptanmıştır. Çalışmada operatif yöntemin kompleks ve uzun olması nedeni ile % 26 oranında mortalite olduğu belirtilmektedir.

1983 yılında Varsos ve ark.(157) tarafından köpeklere stereotaksik çerçeve yardımı ile intrasisternal ponksiyon yapılmış ve otolog kan enjeksiyonu 48 saat ara ile iki kez tekrarlanarak (1 ve 3. günlerde), işlemden 48 saat sonra aminofilin, nifedipin ve papaverine cevap vermeyen, kalıcı vazospazm olduğu gözlenmiştir. Geri döndürülemeyen (irreversible) bu spazm döneminin insandaki kronik vazospazmı yansıttığı belirtilerek bazılar arter üzerinde gelişen morfolojik ve ultrastrüktürel değişiklikler incelenmiştir. Buna göre bazılar arter lümenindeki daralmanın ilk 3 gün içinde %15 ila %40 arasında 5.günde %15 ila %50 arasında değiştiği saptanmıştır.

Aynı yıl, yine aynı araştırma grubu tarafından yayınlanan 2. çalışmada (158) köpeklerde aynı yöntem ile oluşturulan deneysel SAK modelinde kanamaya maruz kalan damar segmentinde ultrastrüktüel incelemeler yapılmış ve kan elemanlarının özellikle damar adventisiasına infiltrasyonu gözlenerek bunun morfolojik ve anjiografik vazospazmın önemli bir göstergesi olduğu belirtilmiştir. Işık mikroskopunda yapılan incelemelerde elde edilen bulguların sadece kan elemanlarının adventisyal infiltrasyonu, belirgin lümen daralması ve bazen eşlik eden endotelial katlanmalarla sınırlı olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada tarif edilen iki enjeksiyonlu SAK modeli (48 saat ara ile 2 kez enjeksiyonu) sonraki yıllarda köpek ve domuzlarda (61) yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır.

1985 yılında Robert Solomon ve ark.(159) tarafından rat sisterna magna'sına 22G plastik kanül yerleştirilerek otolog kan verilmiş ve bu şekilde oluşturulan modelin yeni ve etkili bir deneysel SAK yöntemi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada radyoaktif madde ile işaretlenmiş eritositler kullanılarak kan akım hızı ölçülmüş ve oluşturulan modelde kan akım hızında %38-48'lik bir azalma saptanarak yöntemin güvenilirliği tartışılmıştır. Çalışma sadece akut vazospazm döneminde yapılmış olup bu dönemde bazal 3-6 mmHg olan intrakranial basıncın 10-18 mmHg'ya çıkan sıçramalar gösterdiği, bu basınç, değişikliklerinin kan yada serum fizyolojik enjeksiyonlarında aynı olduğu saptanmıştır.

Aynı yıl Delgado ve ark.(160) tarafından aynı yöntemle yapılan çalışmada, vertebro-bazilar arterlerdeki morfolojik ve histopatolojik değişiklikler anjiyografik ve floresan mikroskopu ile incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ratlarda bifazik spazmın ayrıntılı olarak gösterilmesi nedeni ile önemlidir. Buna göre bu arterlerdeki spazm ilk 10 dakika ve 2.günde pik yapan bifazik karakterdedir. İlk 10 dakikada gelişen spazm akut vazospazmı, 2.günde gelişen spazm ise kronik vazospazmı yansıtmaktadır. Floresan mikroskopu ile yapılan çalışmalarda 2.günde, bu arterler üzerinde histokimyasal olarak görüntülenebilen sempatik sinir terminallerinde belirgin azalma olduğu saptanmıştır. Bazilar arter lümeninde gözlenen daralma akut dönemde %40'a, kronik spazm döneminde ise %27'e ulaşmakta, 5. güne kadar vazospazm tamamen kaybolmaktadır.

1986 yılında Doczi ve ark.(161) tarafından farklı bir deneysel SAK modeli oluşturulmuştur. Buna göre ratlarda kortikal burr-hole ile subaraknoid mesafeye ulaşılarak, kortikal subaraknoid mesafeye otolog kan enjeksiyonu yapılmış ve ICP kontrolü ile kan-beyin bariyer değişimleri, diğer bazı deneysel SAK modelleri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yöntemin diğer deneysel modellere göre üstün olduğu noktalar:

- 1- Sabit subaraknoid kan volümünün sağlanabilmesi,

- 2- Minimal lokal beyin harabiyetine neden olması,
- 3- Internal BOS dolanımının engellenmemesi,
- 4- Kan akımı beyaz cevhere göre çok daha fazla olan gri, kortikal doku ile geniş bir temas yüzeyinin sağlanabilmesi, olarak gösterilmiştir.

1992 yılında Johshita, Kassell ve ark.(152) tarafından yapılan çalışmada tavşanlarda sisterna magna içine otolog kan enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel SAK modelinde bazilar arterin morfolojik değişiklikleri ilk 6 gün içinde periyodik olarak incelenmiştir. Çalışma sırasında hayvanların hiç birinde nörolojik defisit gelişmediği, ilk 2 gün içinde dekapite edilen hayvanlarda bazilar arter çevresinde kalın bir pıhtı olduğu, takip eden günlerde ise bu pıhtının aşamalı olarak rezorbe olduğu belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenmiştir:

Bazilar arterin kontraksiyonu bifazik olup akut kontraksiyon 6.saatte kaybolmakta, 1 ve 2.günlerde tekrar belirginleşmektedir. Akut vazospazm ilk 40 dakika içinde, kronik vazospazm ise 24-48 saatlerde görülmektedir. 3.günden itibaren vazospazm çözülerek yerini vazodilatasyona bırakmakta ve bu dönem oluşan serebral iskemiye yansıtılmaktadır.

Bazilar arter lümen çapında belirgin daralma ve internal elastik laminada bariz kılma, vazospazmın en önemli kriterleridir. Buna karşın media tabakasındaki değişiklikler hayvanlardaki bireysel değişiklikler nedeni ile üniform değildir ve bu nedenle gösterge olarak kabul edilmesi güçtür. En güvenilir kriter olarak internal elastik lamina uzunluğunun hesaplanması gösterilmektedir. İnternal elastik lamina uzunluğundaki değişikliklerin anjiyografik bulgularla paralellik gösterdiği belirtilmektedir. Çalışmamızda SAK oluşturulmasındaki kolaylık ve enzim çalışması için bol doku örneği elde edilebilmesi sebebi ile Johshita'nın tavşan modeli çalışmamız için uygun bulunmuştur.

Stroke akut nörolojik hastalık tanısı ile hospitalize edilen hastaların tahminen yarısını oluşturmaktadır. Strok hastalarının retrospektif incelemesinde tüm strok sendromlarının %75' ini enfarktların, %11' ini intraserebral kanamaların, %5' ini ise subaraknoid kanamaların

meydana getirdiği gösterilmiştir (38,39,40). Serebral kan akımının azalması bir dizi patofizyolojik süreç sonucu beyin iskemisine neden olur. Fokal iskemik semptomlar SAK' da ve muhtemelen migrende oluşan serebral arteriyel vazospazm sonucu meydana gelebilir. Ek olarak iskemik beyin alanından salınan vasokonstriktör maddeler iskemik alanın genişlemesine neden olurlar(37).

1969 yılında McCord ve Fridovich (64) tarafından süperoksit dismutaz (SOD) enziminin bulunması ile serbest radikallerin ayrıntılı olarak çalışılması mümkün olmuştur. 1980 sonrasında özellikle Sano ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ve bilirubin, globin ve demire yıkılması ile oluşan serbest radikaller ve takiben oluşan lipid peroksidlerin, doğrudan ve araşidonik asit metabolizması üzerinden, sitotoksik etki oluşturarak subaraknoidal kanama sonrası vazospazmın oluşumunda potansiyel rol oynadıkları gösterilmiştir(15,42,65,66)

SAK'ı takibeden pıhtı lizisi sonucu açığa çıkan oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu ve demirin serbestleşmesi(77,66) ile oluşan serbest radikallerin lipid peroksidasyonu başlatarak, serebral doku hasarına neden olduğu bilinmektedir. Öte yandan vasküler endotel hasarı intravasküler mikrotrombüs formasyonuna ve bunların perforan damarları tıkanması ile serebral infarkta ve takip eden iskemi-reperfüzyon hasarına yol açabilir(63). Ancak burada söz konusu olan, subaraknoid mesafeye geçen kan elemanları ve yıkım ürünlerinin vazoaktif etkisi, pıhtının neden olduğu anaerobik değişiklikler ve fokal asidoz, damar endotelinden salınan ve düz kas tonusunu etkileyen maddeler, adventisial sempatik denervasyon ve hipotalamik etkilenme sonucu sempatik aktivite artışı gibi birbirini takip eden mekanizmalarla vazospazmın ileri evresinde ortaya çıkan endotel hasarı olup, anevrizma üzerindeki fokal duvar lezyonunun benzer patolojik tabloyu oluşturma olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle bu çalışmada oluşturulan subaraknoid kanama modelinde damar duvar bütünlüğünün korunmuş olmasının elde edilen sonuçları önemli oranda değiştirmeyeceği

düşünülmüştür. Serbest radikaller kendiliğinden meydana gelen reaksiyonlar olarak normal metabolizmada orta derecede meydana gelirler. Mevcut antioksidan mekanizmalar ile (Enzimatik, nonenzimatik) oluşan bu serbest radikaller inaktive edilirler ve ortamdaki uzaklaştırılırlar.

Beyin dokusunda, koruyucu faktörlerden olan SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin aktiviteleri oldukça sınırlıdır. Buna karşın serbest radikallerin oluşumunu tetikleyen demir açısından beyin dokusu oldukça zengindir. Ayrıca SSS' nin beyaz ve gri cevherinde yüksek konsantrasyonlarda askorbik asit bulunur. Bu yüksek konsantrasyon, travma ve iskemide kanın ekstrasvazasyonu sonucu açığa çıkan bakır ve demir iyonlarının varlığında fazla miktarda SOR oluşumuna neden olur(15-19). SOR için iyi bir hedef olan lizozomlar nöronlarda oldukça fazla sayıdadır. Bu radikallerin lizozomal membrana etkisi ile lizozomal hidrolitik enzimler nöronun sitoplazmasına salgılanır. Böylece otodestruksiyon olayı başlar ve doku hasarı tamamlanıncaya kadar bu destrüktif olaylar zinciri devam eder.

SOD üzerinde en çok çalışılmış anti oksidan enzimdir. Nöroprotektif etkisi çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir(162-166). Global ve fokal iskemi/iskemi reperfüzyon çalışmalarında; ilk 1-2 saat içinde aktivitesinde bir düşüş tespit edilmiş reperfüzyon sonrası birkaç gün içinde aktivitenin yeniden yükselerek kontrol değerlerine yaklaştığı belirtilmiştir(162-164). Dışarıdan verilen SOD ile normal dokuda endojen SOD aktivitesinin artırılabilmesine rağmen iskemik/nekrotik dokuda düşen aktivitede düzelme görülmemektedir(166). El nasr ve ark.(165) Ginkgo biloba ekstraktının lipid peroksidasyon, SOD aktivitesi ve glutatyon seviyeleri üzerine etkisini incelemişler. Oluşturulan iskemide SOD aktivitesinde düşüş, iskemi öncesi Ginkgo biloba ekstraktı verilen deneklerde SOD aktivitesinin normale yakın ve paralel olduğu tespit edilmiştir. Mori ve ark.(167) köpek baziller arterinde talk ile oluşturulan vazospazmın SOD ile tedavi edilen grupta engellendiğini göstermişlerdir. Grauner ve ark.(168) yaptıkları klinik çalışmada serebro vasküler olay atağı geçiren hastaların

BOS ve serum örneklerinde SOD aktivitesi, nöron spesifik enolaz, ve laktat dehidrogenaz seviyelerine bakmışlar. İlk 24 saatte kontrol grubu ile paralel olan SOD aktiviteleri 2. günden itibaren yükselmiştir. Yazarlar bunu serbest radikal atağa karşı SOD sentezinin artışı ile açıklamışlardır. Bu tez çalışmasında kontrol grubundaki beyinsapı SOD aktivitesi $162,56 \pm 16,01$ olarak bulunmuştur. SAK grubunda 3.günde hızlı bir yükselme ile $205,63 \pm 14,19$ ulaşmış 10.gün de ise kontrolün hafif altına bir düşüş izlenmiştir (Tablo 1). SAK+MEL grubunda 3.gün hafif fakat anlamlı bir yükselme ($P < 0,05$) takiben 10.günde ciddi bir düşüş gözlenmiştir (Tablo 1). 3. günde her iki grupta izlenen aktivite artışı, SAK sonrası gelişen vazospazm ve iskemi nedeni ile ortaya çıkan serbest radikal artışına karşı bu enzimin indüksiyon cevabı ile açıklanabilir. SAK+MEL grubunda 3. gündeki SAK grubuna göre hafif yükselmenin sebebi ise SOD'dan önce melatoninin antioksidan olarak devreye girmesi böylece SOD'a olan ihtiyacın azalması ile açıklanabileceği kanısındayım. 10. günde SAK grubunda serbest radikal hasar tamamlandığı, SAK+MEL grubunda ise serbest radikal kalmadığı için enzim indüksiyonu ortadan kalktığı ve SOD aktivite değerlerinin normal değerlerin altına indiği düşünülmüştür. Serebeller dokuda da benzer değişiklikler olmuştur.

Süperoksid radikal nitrik oksid sentetaz (NOS) enzim aktivitesini engelleyerek NO^{\bullet} sentezine engel olmakta bu yolla vazospazm gelişimine zemin hazırlamaktadır. SOD süperoksid radikali ortadan kaldırarak NOS aktivitesini korumaktadır(169,170). Hoover ve arkadaşları(171) tarafından invitro endotelial hücre kültürü üzerinde yapılan kontrollu çalışmada nötrofillerin endotel yüzeyine adezyonu ile serbest oksijen radikallerinin oluştuğu ve bunların toksik etkisinin endotel kaynaklı SOD ile önlenmeye çalışıldığı, endotelial SOD inhibe edildiğinde saptanabilir süperoksit radikal miktarında belirgin artış olduğu belirtilmektedir. Hemodializ sırasında alternatif kompleman aktivasyonu ile pulmoner vasküler endotel hasarı ve takibeden pulmoner ödemin nedeni, Sacks ve ark.(172) tarafından invitro endotelial hücre kültürü üzerinde araştırılmış ve nötrofillerin c5a ile aktive olarak endotel üzerinde sitotoksik

etki yaptıkları, bu etkinin serbest radikaller aracılığı ile oluştuğu gösterilmiştir. Oluşan endotel hasarının SOD ve katalaz enzimlerinin ortama birlikte ilave edilmesi ile önlendiği, SOD veya katalaz enzimlerinin yalnız başına ortama eklenmesinin sadece belli oranda koruyucu etkisinin bulunduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Anisimov ve ark.' ları(173) sineklerde yaptıkları bir çalışmada melatonin uygulamasının SOD aktivitesini erkeklerde %7, dişilerde % 20, katalaz aktivitesini %24 arttırdığını, bu sineklerin yaşam sürelerinin anlamlı derecede uzadığını gösterdiler.

Katalaz SOD gibi bir antioksidan enzimdir ve SOD ile birlikte çalışır. Asıl fonksiyonu süperoksitin dismutasyonu ile ortaya çıkan H_2O_2 'i su ve moleküler oksijene parçalamaktır. Katalaz, bütün memeli hücrelerinde genellikle karaciğer peroksizomları, böbrek veya beyin mikroperoksizomları gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip dokuların subselüler organellerinin iç kısımlarında bulunur(174). Montilla ve ark' ları (175) yaptıkları çalışmada Adriamisin vererek ratlarda serbest radikal aracılı renal hasar oluşturarak glutasyon ve katalaz aktivitelerinde anlamlı düşüş olduğunu; aktivitenin dışarıdan verilen melatonin ile anlamlı derecede yükseltilebildiğini, Simonson ve ark. (176) yaptıkları başka bir çalışmada ise iskemik beyin dokusunda monoamin oksidaz aktivitesi ile H_2O_2 oluştuğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada beyin sapı katalaz aktivitesinde; kontrol grubunda $61,74 \pm 7,84$ $\mu\text{mol/mg.total protein}$ iken SAK grubunda 3. günde bu değer düşme göstererek $57,24 \pm 5,6$ $\mu\text{mol/mg.total protein'e}$ inmiştir (Tablo1). Bu düşüş 10. günde daha da belirginleşmekte ve $4,33 \pm 4,46$ $\mu\text{mol/mg.total proteine}$ kadar inmektedir. Buna karşın bu enzim SAK+MEL grubu 3. günde istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmekte ve $90,61 \pm 8,93$ $\mu\text{mol/mg.total proteine}$ ulaşmaktadır ($P < 0,05$). Bu SAK+MEL grubu 10. günde anlamlı olarak yüksek devam etmekte $80,55 \pm 9,94$ $\mu\text{mol/mg.total proteine}$ ulaşmaktadır ($P < 0,05$). Bu çalışmamızda katalaz enzim aktiviteleri SAK gruplarında normalin hemen altında izlenirken SAK+MEL gruplarında

istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu görülmüştür (Tablo1, $P<0,05$). Bu bulgular SAK gruplarında enzim aktivitesinin kullanıma bağlı azaldığı buna karşın SAK+MEL gruplarındaki enzim aktivite yüksekliği, kompetitasyon ve enzim induksiyonu ile açıklanabilir.

Pablos ve ark' ları(177) hiperbarik oksijene maruz bıraktıkları ratlarda çeşitli dokularda serbest radikal hasara baktılar ve GSH-Px ve GSH-R aktivitelerini ölçtüler. Akciğer ve beyinde GSH-Px ve GSH-R aktivitesinin ileri derecede düştüğünü, lipid peroksidasyonunun ileri derecede arttığını tesbit ettiler. Melatonin verilen hayvanlarda ise bu enzimlerin korunduğunu ve serbest radikallerin engellendiğini gösterdiler. Hara ve ark' ları(178) ratlarda aktif eksersiz ile karaciğer dokusundaki oksidatif değişiklikleri incelemişlerdir. Eksersiz sonrası, redükte glutatyonun GSH azaldığı; okside glutatyonun GS-SG arttığı ve GSH/GSSG' nin oksidatif stresin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada eksersiz ile GSH/GSSG oranının karaciğer ve kas dokusunda düştüğü, melatonin verilen hayvanlarda azalmadığı görülmüştür. Beyin dokusu GSH/GSSG oranı eksersiz ile ve melatonin verilmesi ile değişmemiştir. Pablos ve ark' ları(179) tavuklar üzerinde yaptıkları bir çalışmada melatoninin GSH-Px aktivitesini arttırdığını ve bunun doku melatonin konsantrasyonu ile direkt ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Barlow-Walden ve ark' ları(180) ratlara dışarıdan verilen melatoninin GSH-Px aktivitesini arttırdığını, yine aynı çalışmada doku melatonin seviyesine bağlı olarak GSH-Px enzim aktivitesinin gece yarısı en yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Bai ve ark' ları(181) yaptıkları deneysel çalışmada rat beynindeki iskemik alanda SOD ve GSH-Px aktivitesinde azalma yine aynı hayvanlarda iskemi çevresi dokuda GSH-Px aktivitesinde azalma olduğunu gösterdiler. Mc Donald ve ark' ları (182) oksi-hemoglobinin intratekal uygulaması sonucu BOS SOD aktivitesinde değişiklik olmadığını fakat BOS GSH-Px aktivitesinde anlamlı yükselme olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında beyin sapı GSH-R aktivitesi; SAK 3. gün ($1,19\pm0,11$) ve SAK-MEL 3. gün ($0,92\pm0,09$) gruplarında hafif olarak yüksekti. SAK 10. gün ($0,51\pm0,11$) ve SAK-MEL 10. gün ($0,39\pm0,12$) gruplarında

anamlı derecede düşükdü (Tablo1, $P<0,05$). Bu bulgular bu enzimin erken dönemde indüksiyona bağlı olarak arttığı, bununla birlikte 10. günde SAK grubunda serbest radikal hasar tamamlanmış olduğu, SAK+MEL grubunda ise serbest radikal kalmadığı için enzim indüksiyonunun ortadan kalktığı böylece GSH-R aktivitesinin kontrol değerlerinin altına indiğini düşündürmektedir. Serebellar dokuda ise SM 3.gün grubu değerleri kontrol grubu ile aynıdır. SAK 3. gün, SAK 10. gün ve SM 10. gün grubu değerleri kontrol grubuna göre düşüktür. Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo1, $P<0,05$).

Bütün gruplarda beyin sapı GSH-Px (Selenyum bağımlı) enzim aktivite değerleri yüksektir (Tablo1). İstatistiksel değerlendirme yapıldığında SAK 10. gün ve SM 3. gün gruplarında değerler anlamlı olarak yüksektir($P< 0,05$). Serebellar dokuda ise benzer şekilde bütün gruplarda aktiviteler yüksektir (Tablo1). İstatistiksel değerlendirme sonucu SAK 3. gün ve SAK-MEL 3. gün grubu değerleri anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). Bu bulgular, SAK' nın gerek beyin sapında gerekse serebellar dokuda selenyum bağımlı GSH-Px enziminde artışa neden olduğunu buna karşın melatonin verilmesinin bu enzim aktivitesinde azalmaya neden olmadığını göstermektedir.

Özellikle Pineal hormonu olup serotoninin amino grubunun açılmesi ve hidroksi grubunun metillenmesiyle oluşan bir indol türevi olan melatonin bilinen en güçlü serbest radikal tutucu ajandır(25-28). Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilmesi sonucunda çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Literatürde serbest radikal hasarla giden, oksidan enzimlerin yetersiz kaldığı pek çok dejeneratif hastalıkta melatoninin nöronal hasarı engellediği gösterilmiştir. Yine yaşlanma, serbest radikal saldırı ve buna karşı antioksidatif sistem arasındaki dengenin serbest radikal lehine bozulması olarak tarif edilmektedir. Bu düşüncedeki yazarlar melatonin ile antioksidan sistemin desteklenebileceğini ve yaşlanmanın durdurulabileceğini iddia etmektedirler(173,184,185). Bu sebeple melatonine “anti-ageing” hormon denilmektedir.

(184). Yaşlanma ile birlikte melatonin azalmasının olduğu ve bununda yaşlanmaya bağlı çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği ve bu konularda yapılacak olan çalışmaların önemli bir eksikliği gidereceği fikrine varmak mümkündür (185,143). Tan ve arkadaşlarının(26) yaptıkları bir çalışmada serbest radikaller aracılığı ile DNA üzerinde oluşturulan hasarın, Chen ve arkadaşlarının(27) yaptıkları bir çalışmada ise in vitro olarak retinal lipid peroksidasyonunun, melatoninin antioksidan etkisi ile doz bağımlı olarak engellendiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada posterior sirkülasyonda oluşturulan deneysel SAK modelinde beyinsapı dokusundaki anti oksidan enzim değişikliklerine bakılmış ve dışarıdan verilen melatonin ile bu enzimlerdeki değişiklikler incelenmiştir. Melatonin SOD, Katalaz, GSH-R ve selenyum bağımlı GSH-Px seviyelerine etkide genel olarak olumlu bulunmuş ve bu enzim aktivitelerini koruyarak nöral dokuda oluşan serbest radikal hasarı engellemede bir seçenek olarak kullanılabilceği düşünülmüştür. Melatoninin bu antioksidan özelliği üzerindeki çalışmaların geliştirilmesi ve uygulama zamanı ile dozu konusundaki verilerin artması ile bu ajanın, serebral iskemi ve SAK dahil olmak üzere serbest oksijen radikallerinin rol aldığı birçok hastalıkta antioksidan olarak yeni kullanım alanları bulabileceği görüşüne varılmıştır.

SONUÇ

Otolog kanın tavşan sisterna magnasına verilmesi ile oluşturulan SAK modelinde, SAK ve bunu takiben ortaya çıkan serbest radikal hasarın ve vazospazm etkisiyle beyin sapı ve serebellumda ortaya çıkan iskemiye bağlı olarak bu bölgelerdeki antioksidan enzim (SOD, KATALAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ, GLUTATYON REDÜKTAZ) aktiviteleri incelenmiş, tedavideki yeri araştırılmıştır.

Çalışmada:

1) Otolog kanın verilmesini takiben 72. saatte beyin sapında SOD, GSH-R ve GSH-Px aktivitelerinde artış, GSH-R aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir. Kontrol grubu değerleri ile kıyaslandığında, bu değişiklikler GSH-Px grubunda istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

2) Otolog kanın verilmesini takiben 72. saatte serebellumda SOD, Katalaz ve GSH-Px aktivitelerinde artış, Katalaz aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir.

3) Otolog kanın verilmesini takiben 10. günde, beyin sapında GSH-Px aktivitelerinde artış, diğer enzim aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir. GSH-R ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

4) Otolog kanın verilmesini takiben 10. günde, serebellumda GSH-Px aktivitelerinde artış, diğer enzim aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir.

Melatonin uygulanmasını takiben;

5) SM 3. günde tüm gruplarda, beyin sapında, tüm enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. Katalaz ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

6) SM 3. günde tüm gruplarda, serebellum, SOD, Katalaz ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. GSH-Px(selenyum bağımsız) enzim aktivitesi düşüktür. GSH-R enzim aktivitesinde değişiklik izlenmemiştir. Katalaz, SOD ve

GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandıklarında istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

7) SM 10. günde, beyin sapında, Katalaz ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. GSH-Px (selenyum bağımsız), SOD ve GSH-R enzim aktiviteleri düşüktür. GSH-R, SOD, enzim aktiviteleri kontrol grubu ile kıyaslandıklarında istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

8) SM 10. günde, serebellumda, Katalaz SOD,ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. GSH-Px (selenyum bağımsız) ve GSH-R enzim aktiviteleri düşüktür. Katalaz, enzim aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır($P<0,05$).

Melatoninin özellikle erken dönemde SOD, Katalaz, GSH-R ve selenyum bağımlı GSH-Px seviyelerine katkısından dolayı bu enzim aktivitelerini koruyarak nöral dokuda vasospazm sonucu oluşan serebral iskemideki serbest radikal hasarın engellemesinde bir seçenek olarak kullanılabileceği düşünülmüştür

ÖZET

Bu çalışmada tavşanların sisterna magnasına otolog kan verilimi ile SAK modeli oluşturuldu. Bu kanama ile ortaya çıkan serbest radikal hasar ve vazospazmın etkisi ile beyin sapı antioksidan enzimlerinde olan değişiklikler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bir gruba SAK sonrası tedavi amacı ile antioksidan olarak melatonin verilerek bu değişiklikler üzerine olan etkisi araştırıldı.

1) Otolog kanın verilmesini takiben 72. saatte beyin sapında SOD, GSH-R ve GSH-Px aktivitelerinde artış, GSH-R ektiviterinde bir azalma gözlenmiştir. Serebellumda SOD, Katalaz ve GSH-Px aktivitelerinde artış, Katalaz aktivitelerinde bir azalma olmuştur. 10. günde, beyin sapında GSH-Px aktivitelerinde artış, diğer enzim aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir. Serebellumda ise GSH-Px aktivitelerinde artış, diğer enzim aktivitelerinde bir azalma gözlenmiştir. Melatonin uygulanmasını takiben; SM 3. günde bütün gruplarda, beyin sapında, tüm enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. Serebellum, SOD, Katalaz ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. GSH-Px (selenyum bağımsız) enzim aktivitesi düşüktür. SM 10. günde, beyin sapı Katalaz ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir artış vardır. GSH-Px (selenyum bağımsız), SOD ve GSH-R enzim aktiviteleri düşüktür. Serebellumda, Katalaz SOD,ve GSH-Px (selenyum bağımlı) enzim aktivitelerinde belirgin bir dikkati çekmektedir.

Melatoninin özellikle erken dönemde SOD, Katalaz, GSH-R ve selenyum bağımlı GSH-Px seviyelerine katkısından dolayı bu enzim aktivitelerini koruyarak nöral dokuda vasospazm sonucu oluşan serebral iskemideki serbest radikal hasarın engellemesinde bir seçenek olarak kullanılabilceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Biller J, Godersky JC, Adams H. Management of aneurysmal SAH. Stroke 1988; 19:1300-1305.
2. Ingall TJ, Whisnant JP, Wiebers DO et al.. Has there been a decline in SAH mortality? Stroke 1989; 20: 718-721.
3. Weir B. Intracranial aneurysms and SAH. In Wilkins RH and Rengachary: Neurosurgery, McGraw Hill Book Comp., New York, pp 2191-2213. 1996.
4. Sasaki T, Kassel NF. The role of endothelium of cerebral vasospasm, Mayberg M.R. (ed) in Neurosurgery Clinics of North America Vol:1, Cerebral Vasospasm, Philadelphia: WB Saunders, 1990; pp 451-463
5. Smith RR, Miller J.D. Pathophysiology and clinical evaluation of subarachnoid hemorrhage. in Youmans JR(ed): Neurological Surgery Vol 3, Philadelphia, WB Saunders, pp 1644-1660 1990.
6. Allen G. Cerebral arterial Sapsm. Clin Neurosurg 1984; 32: 70-80.
7. Salter TF. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem 1984; 222: 1-15,
8. Echlin FA. Spasm of basillar and vertebral arteries caused by experimental subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 1965; 23: 1-11.
9. Saito I, Shigeno T, Aritake K, et al. Vasospasm assessed by angiography and computerized tomography. J Neurosurgery 1979; 51: 466-475.
10. Saito I, Ueda Y, Sano K. Significance of vasospasm in the treatment of ruptured intracranial aneurysm. J Neurosurg 1977; 47: 412-429.

11. Suzuki J, Takaku A, Suzuki S, et al. Prognostic correlation with cerebral vasospasm and the operation for the intracranial aneurysm. *Brain Nerve* 1970; 22: 1261-1267.
12. Weir B, Erasmo R, Miller J, et al. Vasospasm in response to repeated subarachnoid hemorrhages in the monkey. *J Neurosurg* 1970; 33: 395-406.
13. Weir B, Grace M, Hansen J, et al. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg* 1978; 48: 173-178.
14. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; 247: 6960-6962.
15. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11.
16. Belch JFF. Free radicals and their scavenging in stroke. *Scott Med J* 1992; 37: 67-68.
17. Cadet JL. Free radical mechanisms in the central nervous system: An overview. *Intern J Neuroscience* 1988; 40: 13-18.
18. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *TINS* 1985; Jan : 22-26.
19. Phillis JW . A radical view of cerebral ischemic injury. *Progress in Neurobiology* 1994; 42: 441-448.
20. 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.
21. Hall R, Murdoch J. Brain protection: physiological and pharmacological consideration, Part II: The pharmacology of brain protection. *Can J Anaesth* 1990; 37: 762-777.

22. Althaus JS, Andrus PK, Williams CM, et al. The use of salicylate hydroxylation to detect hydroxyl radical generation in ischemic and traumatic brain injury. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 20:147-162.
23. Andrus PK, Taylor BM, Sun FF, Hall ED. Effect of the lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate (U-74006F) on gerbil brain eicosanoid levels following ischemia and reperfusion. *Brain Res* 1994; 659: 126-132.
24. Pietronigro DD, Hovsepian M, Demopoulos HB; et al. Loss of ascorbic acid from injured feline spinal cord. *J Neurochem* 1983; 41: 1072-1076.
25. Tan DX, Chen LD, Poeggeler LC, et al. Melatonin : a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine* 1993; 1: 57-60.
26. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA- adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Letters* 1993; 70: 65-71.
27. Chen LD, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. Retinal lipid peroxidation in vitro is inhibited by melatonin. *Neuro Res Comm* 1995; 17: 151-158.
28. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, et al. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15: 103-116.
29. Youmans JR. *Neurological Surgery*, WB Saunders Co, Philadelphia. Pp. 1644-1660. 1990.
30. Freytag, E. Fatal rupture of intracranial aneurysms; Survey of 250 medicolegal cases. *Arch. Pathol.* 1966; 81: 418-424..
31. Pakarinen, S. Incidence, aetiology, and prognosis of primary subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 1967; 29: 1-128..

32. Tsementzis S A, and Williams A. Ophthalmological signs and prognosis in patients with a subarachnoid hemorrhage. *Neurochirurgia* 1984; 27: 133-135.
33. Muller PJ, and Deck HN. Intraocular and optic nerve sheath hemorrhage in cases of sudden intracranial hypertension. *J Neurosurg* 1974; 41:160-166.
34. Lougheed WM, Barnet HJM. Lesions producing spontaneous hemorrhage. In Youmans JR.(ed.). *Neurological Surgery*, WB Saunders Co, Toronto, pp 709-723, 1973.
35. Wilkins Rh. Update-SAH and saccular intracranial aneurysms. *Surg Neurol* 1981, 15:92-102.
36. Leblanc R. The minor leak preceding SAH. *J.Neurosurg* 1987; 66:35-41.
37. Dyken M, Wolf PA, Barnett H J M, Bergan J J, Hass WK, Kannel WB, Kuller L, Kurtzke JF, and Sundt TM. Risk factors in stroke. *Stroke* 1984; 15:1105-1111.
38. Anderson GL, and Whisnant JP. A comparison of trends in mortality from stroke in United States and Rochester, Minnesota. *Stroke* 1982; 13:804-809.
39. Robins M, and Baum HM. The National Survey of Stroke. Incidence. *Stroke* 1981; 12 (Suppl. 1): 45-55.
40. Sacco RL, Wolf PA, Kannel WB, and McNamara PM. Survival and recurrence following stroke: The Framingham Study. *Stroke* 1982; 13: 290-295.
41. Hossmann KA. Treatment of experimental cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Floww Metab* 1982; 2:275-279.

42. Pickard LD, Nelson RJ, Martin JL. Cerebral vasospasm. Crocard A, Hayward R, Hoff JT, (ed) in Neurosurgery. The scientific basis of clinical practice Vol:1, Boston, Blackwell pp 417-437 1992.
43. Barker II FG, Heros RC. Neurosurgery Clinics of North America Vol: 1 Clinical aspects of vasospasm. Philadelphia: WB Saunders pp 277-288 1990.
44. Yaşargil MG. Clinical considerations, surgery of the intracranial aneurysms and results In. Microneurosurgery Vol.II,Thieme Stratton Inc..New-York pp 17-18 1984.
45. Adams HPjr, Kassell NF, Torner JC, Haley ECJ. Predicting cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: influences of clinical condition, CT result, and antifibrinolytic therapy. A report of the cooperative aneurysm study. Neurology 1987; 37:1586-1591.
46. Kapp J, Mahaley MS, Odom GL. Cerebral arterial spasm. Part 2: Experimental evaluation of mechanical and humoral factors in pathogenesis. J. Neurosurgery 1968; 29:339-349.
47. Powers WJ, Grubb RLjr, Baker RP, et.al. Regional cerebral blood flow and metabolism in reversible ischemia due to vasospasm: determination by positron emission tomography. J Neurosurg 1985;62: 539-546.
48. Crompton MR. The pathogenesis of cerebral infarction following to rupture of the cerebral berry aneurysms. Brain 1964;87: 491-510.
49. Hongo K, Kassell NF, Nakagomi T, et al. Subarachnoid hemorrhage inhibition of endothelium-derived relaxing factor in rabbit basilar artery. J Neurosurg 1988; 69:247-253.

50. Masaoka H, Suzuki R, Hirata Y, Emori T. Rised plasma Endothelin in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Lancet* 1989;2:1402(letter)
51. Kobayashi H, Hayashi M, Kobayashi S. Cerebral vasospasm and vasoconstictioncaused by endothelin. *Neurosurgery* 1991; 28:673-679.
52. Chyatte D. Anti-inflammatory agent and cerebral vasospasm. *Neurosurg Clin North Am* 1990; 1:433-450.
53. Peterson JW, Kwun BD, Hackett JD, Zervas NT. The role of inflammation in experimental vasospasm. *J Neurosurg* 1990;72:767-774.
54. Kasamo S, Asakura T, Yamamoto Y. Posttraumatic cerebrovascular narrowing. A case report and review of the literature. *No Shinkei Geka* 1984 Nov; 12: 1411-1416.
55. Peerless SJ, Yaşagil MG. Adrenergic innervation of the cerebral blood vessels in the rabbit. *J Neurosurg* 1971; 35: 148-154.
56. Svendgaard NA, Arbab MAR, Delgado TJ, Rosengren E. Effect of selective lesions of medullary catecholamine nuclei on experimental cerebral vasospasm in the rat. *J. Cerebral Blood Flow and Met* 1987; 7:21-28..
57. Svendgaard NA, Brismar J, Delgado TJ, Rosengren E. Subarachnoid hemorrhage in the rat: Effect on the development of vasospasm of selective lesions of the catecholamine systems in the lower brain stem. *Stroke* 1985; 16(4): 602-608.
58. Suzuki J, Yoshimoto T. Early operation for the ruptured intracranial aneurysm-especially the cases operated within 48 hours after the last subarachnoid hemorrhage. *Neurol Surg* 1976; 4:135-141.

59. Iwayama T, Furness JB, Burnstock G. Dual adrenergic and cholinergic innervation of the cerebral arteries of the rat. *Circ Research* 1970; 26: 635-6.
60. Özgen T. Deneysel subaraknoid kanamanın uyardığı vezospazma intraknial periarterial sempatektominin etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji ABD, Doçentlik tezi, Ankara, 1979
61. Yoshioka J, Clower BR, Smith RR. The Angiopathy of subarachnoid hemorrhage I. Role of vessel wall catecholamines. *Stroke* 1984; 15: 288-294.
62. Grubb R LJr, Raichle ME, Elichling JO, et al. Effect of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow and oxygen utilization in humans. *J Neurosurg* 1977; 44: 446-452.
63. Suzuki S, Ohura R, Iwabuchi T, Yoshimura N. Cerebral microtrombosis, synthesis imbalance of TXA₂- PGL₂ and subarachnoid focal acidosis in the pathogenesis of symptomatic vasospasm. Suzuki J (ed) in *Advances in surgery for cerebral stroke*. Japan, Springer-Verlag 1988; 405-410.
64. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 1969 Vol. 244, No.22. 6049-6055, November 25.
65. Pryor WA. Free radical biology Xenobiotics, cancer, and aging. *Ann NY Acad Sci* 1982; 393 1-22.
66. Sano K, Asano T, Tanishima T, Sasaki T. Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res* 1980; 2: 253-272.
67. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21-48.

68. Ikeda Y, Anderson JH, Long DM. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. *Neurosurgery* 1989; 24: 679-685.
69. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and Tissue injury. *Laboratory Investigation* 1982; 47: 412-426.
70. Hinder RA. Oxygen - derived free radicals. *Arch Surg* 1991; 126: 104-105.
71. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
72. Webster NR, Nunn JF. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* 1988; 60: 98-108.
73. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
74. Badway JA, Karnovsky ML. Active oxygen species and the function of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem* 1980; 49:695-726.
75. Dutka AJ, Kchanek PM, Hallenbeck JM. Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 1989; 20: 390-395.
76. Hallivel B, Okezie IA. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS* 1991; 281: 9-19.
77. Misra HP, Fridovich I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J Biol Chem* 1972; 247: 188-192.
78. Misra HP. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem* 1974; 249: 2151-2155.

79. Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974; 249: 2447-2452.
80. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23:21-48.
81. Mello FAC, Meneghini R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weis reaction. *Biochem Biophys Acta* 1984; 781:56-63.
82. Starke PE, Farber JL. Ferric iron and superoxid ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by iron-catalyzed Haber-Weis reaction. *J Biol Chem* 1985; 269: 10099-10104.
83. Slivka A, Cohen G. Hydroxyl radical attack on dopamine. *J Biol Chem* 1985; 260: 15466-15472.
84. Cadet JL. Free radicals and tardive dyskinesia. *TINS* 1986; 9:107- 108.
85. Deneke SM, Fanburg BL. Normobarik oxygen toxicity of the lung. *New Eng J Med* 1980; 303: 76-86.
86. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985; 312: 159-167.
87. Packer L, Almada AL, Rothfuss LM, et al. Modulation of tissue vitamin E levels by Physical Exercise, *Ann NY Acad Sci* 1989; 570: 296- 300.
88. Biemond P, Eijk HG, Swak AJG, Koster JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1984; 73: 1576-1579.

89. Kanemitsu H, Tamura A, Sano K, et al. Changes of uric acid level in rat brain after focal ischemia. *J Neurochem* 1986; 46: 851-853.
90. Goeptar AR, Groot Ed J, Scheerens H, Commandeur Jan NM, Vermeulen Nico PE. Cytotoxicity of mitomycin C and adriamycin in freshly isolated rat hepatocytes: The role of cytochrome P450. *Cancer Research* 1994; 54, 2411-2418, May 1.
91. Kahl R. Synthetic antioxidants: Biochemical actions and interferences with radiations, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogenesis. *Toxicology* 1984; 33: 185-228.
92. Furchott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)* 1980; 288:373-376.
93. Snyder SH. Nitric oxide and neurons. *Curr Opin Neuro Biol.* 1992; 2:323-328.
94. Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Ford PC. The fenton oxidation mechanism: Reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; Vol.91, 6604-6608, July.
95. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Intern J Neuroscience* 1991; 57: 1-17.
96. Gutteridge JMC. Copper-phenanthroline induced site-specific oxygen-radical damage to DNA. *Biochem J* 1984; 218: 983-985.
97. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, et al. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction *British Medical Bulletin* 1993; 49: 506-522.

98. Fridovich I, Freeman Bruce. Antioxidant defenses in the lung: *Ann. Rev. Physiol* 1986; 48: 693-702.
99. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development* 1990; 51, 283-297.
100. Troll W, Wiesner R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Pharmacol* 1985; *Toxicol.*: 25, 509-528.
101. Burton GW, Foster DO, Perly B, Slater T.F, Smith ICP, Ingold KU. Biological antioxidants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* 1985; B 311, 565-578.
102. Stryer L. *Biochemistry*. Pp. 436-437. Freeman and Company New York 1988.
103. Sohal RS, Allen RG. Oxidative Stress As a Causal Factor in Differentiation and Aging: A Unifying Hypothesis. *Experimental Gerontology* 1990; Vol. 25. pp.449-522.
104. Sun Y, Oberley LW, Elwell J.H, Rivera ES. Antioxidant Enzyme Activities in Normal and Transformed Mouse Liver Cells. *Int. J. Cancer* 1989; 44. 1028-1033.
105. Mailer K, Maestro RF. Stability of The Anti-Oxidative Enzymes in Aqueous and Detergent Solution. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1991; 107: 47-54.
106. Mavelli I, Rigo A, Federico R, Cinola MR, Rotilio G. Superoxide Dismutase, Glutathione peroxidase, Catalase in Developing Rat Brain. *Biochem. J.* 1982; 204. 535-540.

107. Mavelli I, Rotilio G. Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes. *Advances on Oxygen Radicals and Radioprotectors*. 1984; pp.65-80.
108. Vatassery GT, Smith WE, Quach HT. Ascorbic Acid, Glutathione and Synthetic Antioxidants Prevent The Oxidation of Vitamin E in Platelets. *Lipids*. Vol. 24. No. 12.1989. pp. 1043-1047.
109. Mackay WJ, Bewley GC. The genetics of Catalase in *Drosophila melanogaster*: Isolation and Characterication of Acatesemic Mutants. *Genetics Society of America* 1989; pp. 643-651.
110. Weber GF, Bruch HP. Die pharmakologie der superoxide-dismutase: *Pharmazie* 1992; 47, H.3, 159-167.
111. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase 1988;4/3, 479-500.
112. Mavelli I, Rotilio G. Oxygen Free Radicals and Tumör Cells. *Isosanooids and Cancer* 1984; pp.1-9.
113. Amstad P., Peskin A., Shah G., Mirault M.E., Moret R., Zbinden I., Cerutti P.: The Balance Between Cu, Zn superoxide Dismutase and Catalase Affects The Sensitivity of Mouse Epidermal Cells to Oxidative Stress. *Biochemistry* 1991. 30. 9305-9313.
114. Scott MD, Lubin BH, Zio L, Kuypers FA. Erythrocyte Defence Against Hydrogen Peroxide: Preeminent Importance of Catalase. *J. Lab. Clin. Med.* 1991; July.
115. Ermler U, Ghisla S, Massey V, Schulz GE. Structural Spectroscopic and Catalytic Activity Studies on Glutathione Reductase Reconstitued with FAD Analogues. *Eur. J. Biochem* 1991; 199, 133-138.

116. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione Reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113: 484-490.
117. Thieme R, Pai EF, Sehirmer RH, Schultz EE. Three dimer sinol structure of glutathione reductase at 2 a resolution. *S. Mol. Biol* 1981; 152: 763-782.
118. Natta CL, Chen IC, Chow C.K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol* 1990; 83, 130-132.
119. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem* 1991; 37/11, 1932-1937.
120. Takahashi K, Cohen HJ. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* 1986; Vol.68, No.3, 640-645.
121. Gaetani GF, Galiano S, Capena L, Ferraris A.M, Kirkman H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; Vol.73, No.1, 334-339.
122. Hall ED, Pazara KE, Braugher JM. Effects of tirilazad mesylate on postischemic brain lipid peroxidation and recovery of extracellular Calcium in gerbils. *Stroke* 1991; 22: 361-366.
123. Barut Ş, Canbolat A, Aydın Y et al. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time -level relationship. *Neurosurg Rev* 1993; 16; 53-59.
124. Faden AI. Pharmacotherapy in spinal cord injury: a critical review of recent developments. *Clin Neuropharmacol* 1987; 10: 193-204.
125. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 1985; 57: 508-516.

126. Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg* 1986; 64: 803-807.
127. Wei EP, Kontos HA, Dietrich WD, et al. Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of pial arteriolar abnormalities from concussive brain injury in cats. *Circ Res* 1981; 48: 95-103.
128. Olesen SP. Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta Physiol Scand* 1987; 129: 181-187.
129. Hall ED, Yonkers PA, McCall JM, et al. Effects of the 21-aminosteroid U74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg* 1988; 68: 456-461.
130. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals and antioxidant protection: Mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human Toxicol* 1988; 7: 7-13.
131. Ikeda Y, Ikeda K, Long DM. Protective effect of the iron chelator deferoksamine on cold- induced brain edema. *J Neurosurg* 1989; 71:233-238.
132. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury, *British Medical Bulletin* 1993; 49: 700-718.
133. Balentine JD, Paris DU. Pathology of experimental spinal cord trauma. *Lab Invest* 1978; 39: 254-266.
134. Friedl HP, Smith DJ, Till GO, et al: Ischemia- reperfusion in humans. *Am J Pathol* 1990; 136: 491-495.

135. Sonecki P, Olczyk K, Gralewski Z, et al. Superoxide dismutase and lipid peroxidation in fluid of patients with ischemic brain stroke. *Acta Biol pol* 1994; 41: 148-150.
136. Imre SG, Fekete I, Farkas T. Increased proportion of docosahexanoic acid and high lipid peroxidation capacity in erythrocytes of stroke patient. *Stroke* 1994; 25: 2416-2420.
137. Hajimohammedreza I, Brammer M. Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 1990; 112:333-337.
138. Dykens JA, Stern A, Trenkner E. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *Neurochem* 1987; 49: 1222-1228.
139. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 1960; 235: 1992-1997.
140. Kappers JA. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir* 1976; 34:109-149.
141. Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE, et al. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 1981; 109: 1295-1297.
142. Koçak A, Çolak. Melatonin ve santral sinir sistemi. *Turgut Özal Tıp Merkezi dergisi* 1996;3: 237-244.
143. Tapp E, Huxley M. The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Path* 1972; 108: 137-144.

144. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: Structure and function. *Am J Anat* 1981; 162: 287-313.
145. Romijn HJ. The pineal, a tranquillizing organ? *Life Sci* 1978; 23: 2257-2274.
146. Worzniak DF, Stewart GR, Miller P, Olney JW. Brief communication: Age-related sensitivity to kainat neurotoxicity. *Exp Neurol* 1991; 114:250-253.
147. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14: 151-168.
148. Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund. High solubility of melatonin in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994.
149. Reiter RJ. Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp* 1994; 54(Suppl): 31-39.
150. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler , et al. Melatonin as a free radical scavenger : implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1-11,
151. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin : antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993.
152. Johshita H, Kassel NF, Sasaki T, et al. Biphasic constriction of rabbit basilar artery following experimental subarachnoid hemorrhage: a morphometric study. *Surg Neurol* 1992; 37:106-114.

153. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem* 1951; 193-265.
154. Luck H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* 1963; pp. 885-888.
155. Lawrance RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications V*; Vol.71, No.4, 952-958.
156. Barry K, Gogjian MA, Stein BM. Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Stroke* 1979; 10: 538-542.
157. Varsos VG, Liszczak TM, Han DH, et al. Delayed cerebral vasospasm is not reversible by aminophylline, nifedipine, or papaverine in a two hemorrhage canine model. *J Neurosurg* 1983; 58: 11-17.
158. Liszczak T.M., Varsos V.G., Black P.McL., et al. Cerebral arterial constriction after experimental subarachnoid hemorrhage is associated with blood components within the arterial wall. *J Neurosurg* 1983; 58:18-26.
159. Solomon RA, Antunes J, Chen RYZ, et al. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke* 1985; 16: 58-64.
160. Delgado T, Brismar J, Svendgaard NA. Subarachnoid hemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke* 1985; 16: 595-602.
161. Doczi T, Joo F, Adam G, et al. Blood brain barrier damage during the acute stage of subarachnoid hemorrhage, as exemplified by a new animal model. *Neurosurgery* 1986; 18: 733-739.

162. Murakami K, Kondo T, Epstein CJ, Chan PH. Over expression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997 28:1797-1804.
163. Francis JW, Ren J, Warren L, Brown RH Jr, Finklestein SP. Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD: Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp Neurol*, 1997 Aug; 146(2): 435-443.
164. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997 Jun 1;17(11): 4180-4189.
165. Seif-El-Nasr M, El-Fattah A.A. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischaemia: effect of ginkgo biloba extract. *Pharmacol Res* 1995 Nov; 32(5): 273-278.
166. Stanimirović DB, Marković M, Micić DV, Spatz M, Mrsulja BB. Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces ischemia/reperfusion 'oxidative stress' in gerbil brain. *Neurochem Res* 1994 Dec;19(12): 1473-1478.
167. Mori T, Nagata K, Matsui T, Ishida T, Ohami H, Asano T. Superoxide anions in the pathogenesis of talc-induced cerebral vasoconstriction. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995 Oct, 21(5): 378-385.
168. Gruener N, Gross B, Gozlan O, Barak M. Increase in superoxide dismutase after cerebrovascular accident. *Life Sci* 1994;54(11): 711-713.

169. Sakashita N, Ando Y, Yonehara T, Tanaka Y, Sato K, Uchino M, Ando M. Role of superoxide dismutase and nitric oxide on the interaction between brain and systemic circulation during brain ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1994 Oct 21;1227(1-2): 67-73.
170. Chan PH, Epstein CJ, Li Y, Huang TT, Carlson E, Kinouchi H, Yang G, Kamii H, Mikawa S, Kondo T, et al. *J Neurotrauma* 1995 Oct; 12(5): 815-824.
171. Hoover RL, Robinson JM, Karnovsky MJ. Adhesion of polymorphonuclear leukocytes to endothelium enhances the efficiency of detoxification of oxygen free radicals. *Am J Pathol* 1987; 126: 258-268.
172. Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, et al. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J Clin Invest* 1978; 61: 1161-1167.
173. Anisimov VN, Mylnikov SV, Oparina TI, Khavinson VK. Effect of melatonin and pineal peptide preparation epithalamin on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster*. *Mek Ageing Dev* 1997 Aug;97(2): 81-91.
174. Mavelli I, Rotilio G. Enzymatic protection against intracellular oxidative processes. *Advances on oxygen radicals and radioprotectors*. Ed. Breccia A, Greenstock CL, Tamba M. Edizioni Scientifiche 1984; 65-80.
175. Montilla P, Tunez I, Munoz MC, Lopez A, Soria JV. Hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin: effect of melatonin administration. *Nephron* 1997; 76(3):345-350.
176. Simonson SG, Zhang J, Canada ATJr, Su YF, Benveniste H, Piantadosi C.A. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during

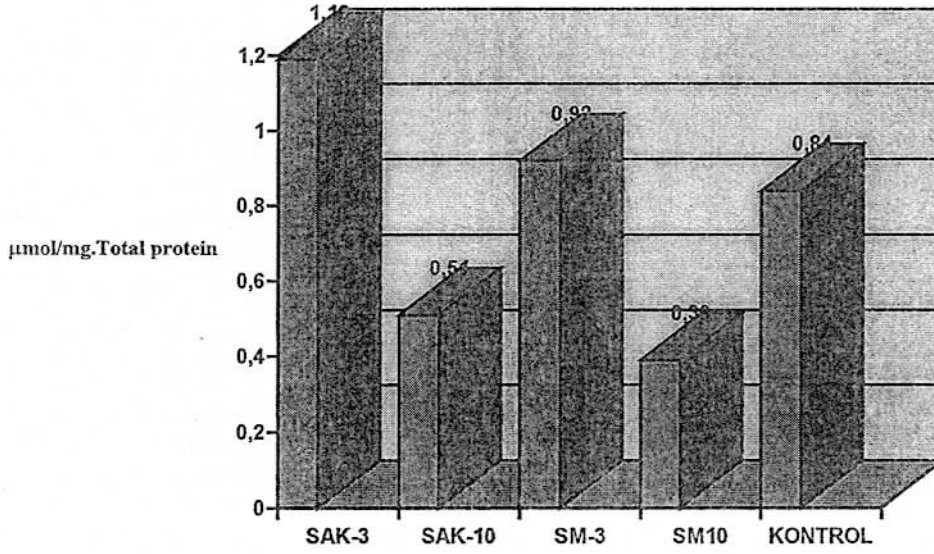
- ischemia-reperfusion in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993 Jan; 13(1): 125-134.
177. Pablos MI, Reiter RJ, Chuang JI, Ortiz GG, Guerrero JM, Sewerynek E, Agapito MT, Melchiori D, Lawrence R, Deneke SM. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J Appl. Physiol* 1997; 83:354-358.
178. Hara M, Iigo M, Ohtani-kaneko R, Nakamura N, Reiter RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol signal* 1997; 6:90-100
179. Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Acuna-Castroviejo D, Menendez-Pelaez A. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 1995 Oct; 19(3): 111-115.
180. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995 May; 26(5): 497-502.
181. Bai Y. A study on the activity of three antioxidant enzymes in the brain of acute cerebral ischemia. *Chung Hua Shen Ching Ching Shen KO Tsa Chich* 1992; Dec; 25(6): 351-354.
182. Macdonald RL, Weir BK, Runzer TD, Grace MG. Malondialdehyde, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in cerebrospinal fluid during cerebral vasospasm in monkeys. *Can J Neurol Sci* 1992 Aug; 19(3): 326-332.

- ischemia-reperfusion in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993 Jan; 13(1): 125-134.
177. Pablos MI, Reiter RJ, Chuang JI, Ortiz GG, Guerrero JM, Sewerynek E, Agapito MT, Melchiori D, Lawrence R, Deneke SM. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J Appl. Physiol* 1997; 83:354-358.
178. Hara M, Iigo M, Ohtani-kaneko R, Nakamura N, Reiter RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol signal* 1997; 6:90-100
179. Pablos Mİ, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Acuna-Castroviejo D, Menendez-Pelaez A. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 1995 Oct; 19(3): 111-115.
180. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995 May; 26(5): 497-502.
181. Bai Y. A study on the activity of three antioxidant enzymes in the brain of acute cerebral ischemia. *Chung Hua Shen Ching Ching Shen KO Tsa Chich* 1992; Dec; 25(6): 351-354.
182. Macdonald RL, Weir BK, Runzer TD, Grace MG. Malondialdehyde, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in cerebrospinal fluid during cerebral vasospasm in monkeys. *Can J Neurol Sci* 1992 Aug; 19(3): 326-332.

183. Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to ageing: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995 May; 30(3-4): 199-212.
184. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 1995 Apr;9(7): 526-533.
185. Koçak A, Çolak A. Serbest oksijen radikalleri ve santral sinir sistemi. *Karadeniz Tıp Dergisi (Baskıda)*

EKLER

Grafik Ek1: GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ
(BEYİN SAPI)

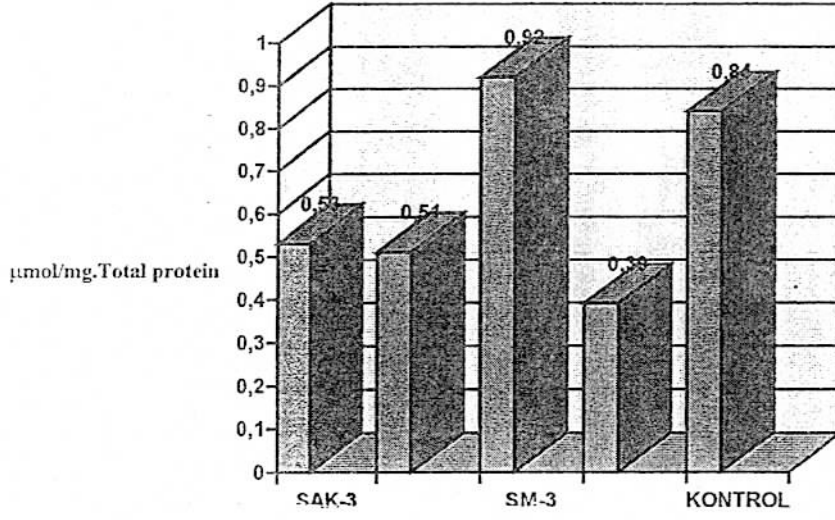


Tablo Ek 1. GSH-R Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Beyin sapı)

GSH-R Beyinsapı	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	1,186±0,112	0,508±0,105	0,915±0,085	0,387±0,116	0,844±0,069
SAK3 1,186±0,112	————	P = 0,0019	P = 0,1049	***	P = 0,0650
SAK10 0,508±0,105	————	————	***	P = 0,5054	P = 0,0375
SM3 0,915±0,085	————	————	————	P = 0,0070	P = 0,7984
SM10 0,387±0,116	————	————	————	————	P = 0,0148
KONTROL 0,844±0,069	————	————	————	————	————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Grafik Ek2 : GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ
(SEREBELLUM)

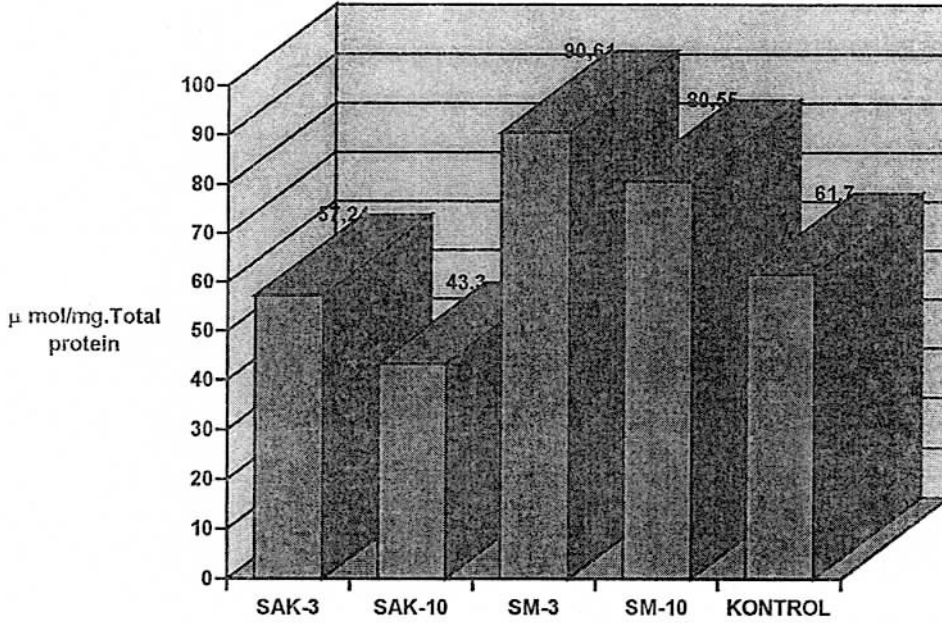


Tablo Ek 2. GSH-R Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi
(Serebellum)

GSH-R Serebellum	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	0,528±0,43	0,489±0,164	0,683±0,070	0,590±0,230	0,671±0,061
SAK3 0,528±0,43	————	P = 0,1304	P = 0,1949	***	P = 0,1049
SAK10 0,489±0,164	————	————	***	P = 0,8665	P = 0,1049
SM3 0,683±0,070	————	————	————	P = 0,2810	P = 1,0000
SM10 0,590±0,230	————	————	————	————	P = 0,3357
KONTROL 0,671±0,061	————	————	————	————	————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Grafik Ek3 : KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİ
(BEYİN SAPI)

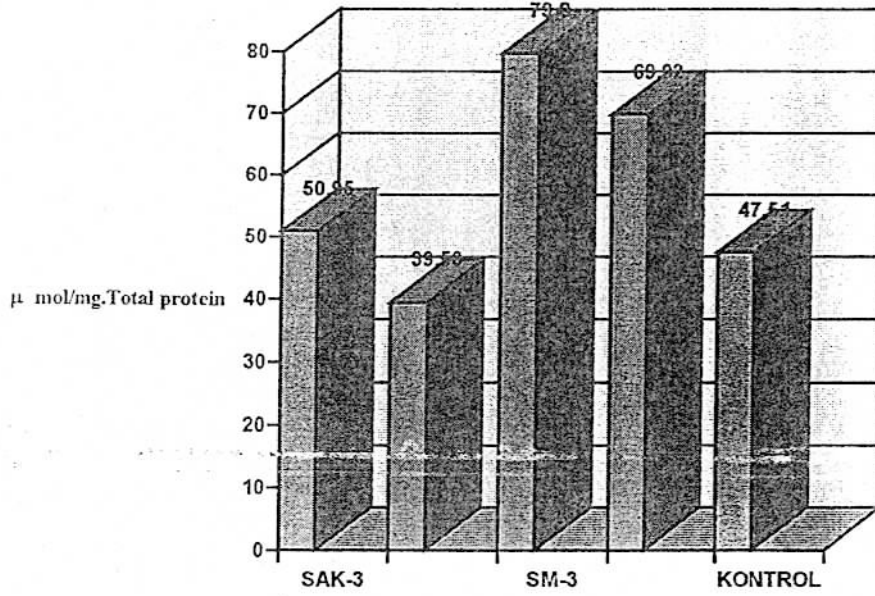


Tablo Ek 3 : Katalaz Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Beyin sapı)

KATALAZ Beyinsapı	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	57,24±5,6	43,299±4,456	90,606±8,934	80,551±9,942	61,743±7,837
SAK3 57,24±5,6	—————	P = 0,1304	P = 0,0148	***	P = 0,6454
SAK10 43,299±4,456	—————	—————	***	P = 0,0030	P = 0,0650
SM3 90,606±8,934	—————	—————	—————	P = 0,4418	P = 0,0148
SM10 80,551±9,942	—————	—————	—————	—————	P = 0,7209
KONTROL 61,743±7,837	—————	—————	—————	—————	—————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

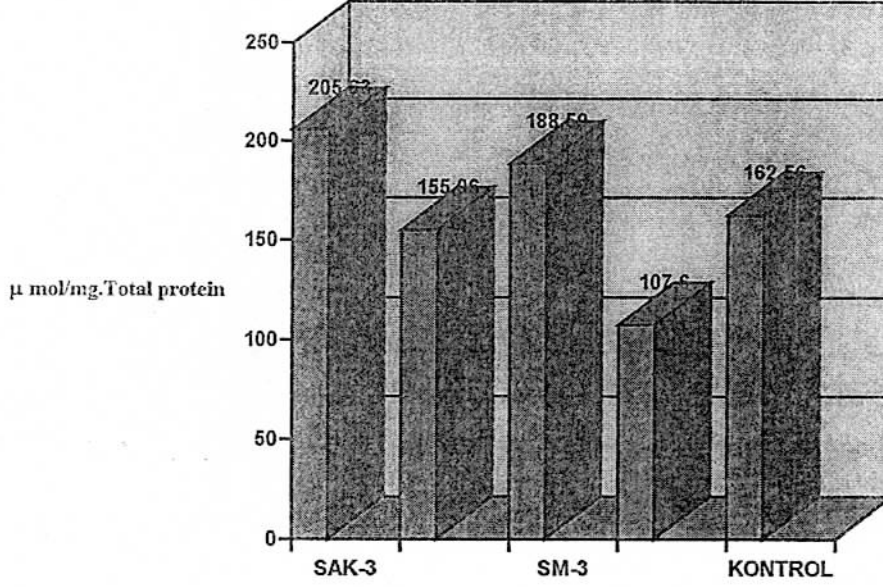
Grafik Ek4 : KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİ
(SEREBELLUM)



Tablo Ek 4 : Katalaz Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi
(Serebellum)

KATALAZ Serebellum	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	50,954±10,659	39,53±5,705	79,8±8,447	69,92±5,984	47,506±5,389
SAK3 50,954±10,659	—————	P = 0,5737	P = 0,0499	***	P = 0,9591
SAK10 39,53±5,705	—————	—————	***	P = 0,0093	P = 0,3820
SM3 79,8±8,447	—————	—————	—————	P = 0,4634	P = 0,0070
SM10 69,92±5,984	—————	—————	—————	—————	P = 0,0289
KONTROL 47,506±5,389	—————	—————	—————	—————	—————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

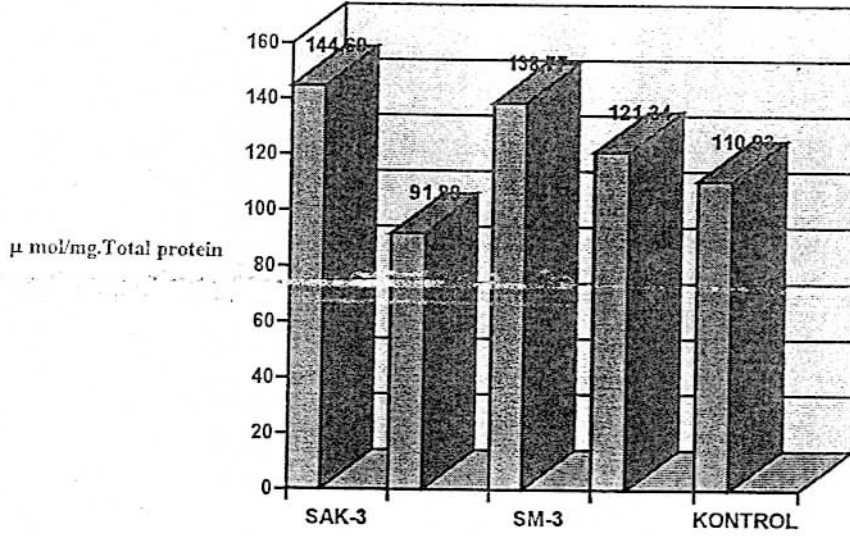
Grafik Ek5 : SOD ENZİM AKTİVİTESİ
(BEYİN SAPI)

Tablo Ek 5 : SOD Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Beyin sapı)

SOD Beyinsapı	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
SAK3	205,63±14,19	155,06±25,57	188,59±13,11	107,6±10,77	162,56±16,01
SAK10	—	P = 0,1049	P = 0,4418	***	P = 0,0650
SM3	—	—	—	P = 0,2786	P = 0,5737
SM10	—	—	—	P = 0,0002	P = 0,3823
KONTROL	—	—	—	—	P = 0,0281

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Grafik Ek 6 : SOD ENZİM AKTİVİTESİ
(SEREBELLUM)

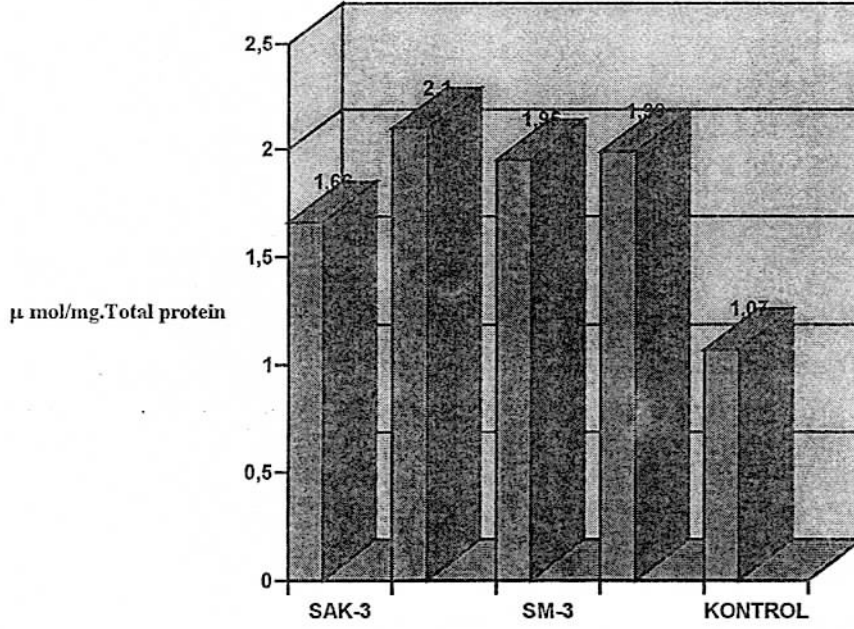


Tablo Ek 6 : SOD Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Serebellum)

SOD Serebellum	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	144,69±10,15	91,88±3,79	138,77±7,7	121,34±14,71	110,93±12,40
SAK3 144,69±10,15	————	P = 0,0003	P = 0,7209	***	P = 0,0650
SAK10 91,88±3,79	————	————	***	P = 0,1206	P = 0,4418
SM3 138,77±7,7	————	————	————	P = 0,7789	P = 0,0499
SM10 121,34±14,71	————	————	————	————	P = 0,5358
KONTROL 110,93±12,40	————	————	————	————	————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

**Gafik Ek7 : GLUTATYON PEROXİDAZ
SELENYUM BAĞIMLI
(BEYİN SAPI)**



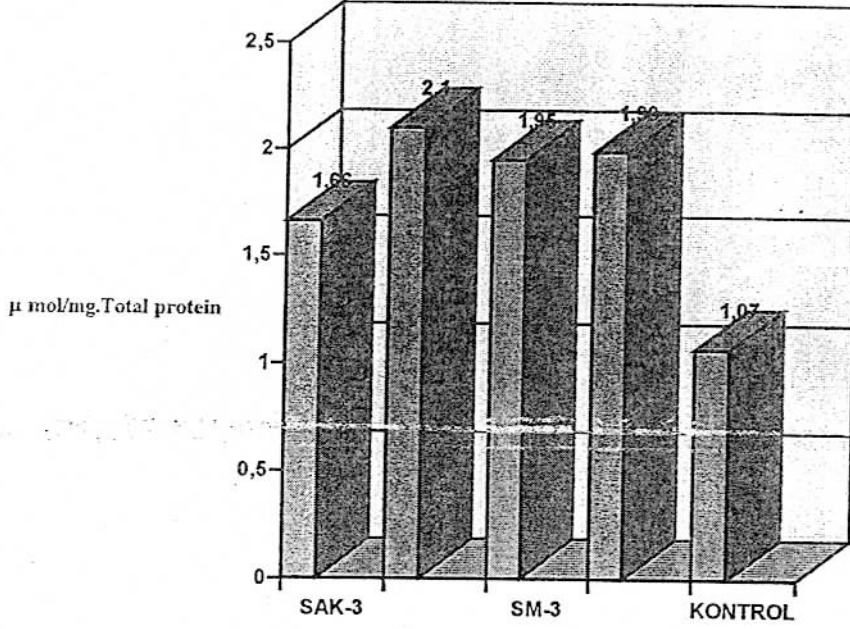
Tablo Ek 7 : GSH-Px (Selenyum bağımlı) Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Beyin sapt)

GSH-Px (Sel+) Beyinsapt	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	1,66±0,39	2,1±0,36	1,95±0,17	1,99±0,37	1,07±0,21
SAK3 1,66±0,39	—————	P = 0,3823	P = 0,2786	***	P = 0,2786
SAK10 2,1±0,36	—————	—————	***	P = 0,9591	P = 0,0379
SM3 1,95±0,17	—————	—————	—————	P = 0,5054	P = 0,0281
SM10 1,99±0,37	—————	—————	—————	—————	P = 0,0650
KONTROL 1,07±0,21	—————	—————	—————	—————	—————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Sel+ Selenyum Bağımlı

Grafik Ek8 : GLUTATYON PEROXİDAZ
SELENYUM BAĞIMLI
(SEREBELLUM)



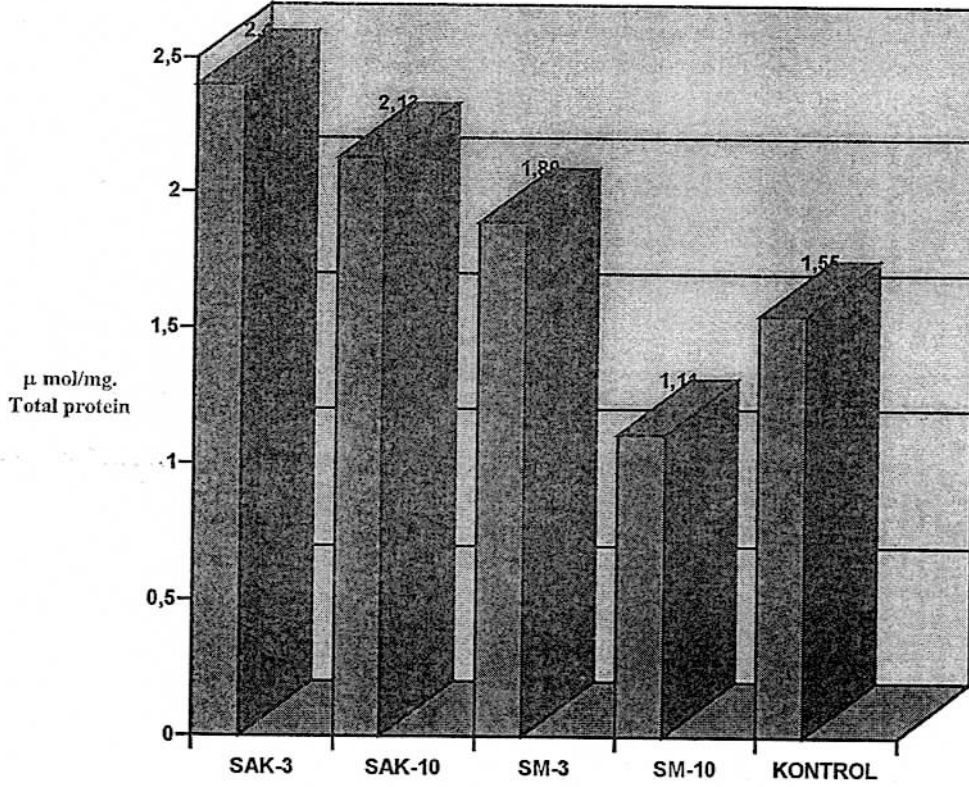
Tablo Ek 8 : GSH-Px (Selenyum bağımlı) Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Serebellum)

GSH-Px (Sel+) Serebellum	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	2,34±1,23	1,98±0,43	2,22±0,2	2,0±0,31	1,29±0,14
SAK3 2,34±1,23	————	P = 0,5737	P = 0,7209	***	P = 0,0207
SAK10 1,98±0,43	————	————	***	P = 0,6943	P = 0,4418
SM3 2,22±0,2	————	————	————	P = 0,6126	P = 0,0030
SM10 2,0±0,31	————	————	————	————	P = 0,1520
KONTROL 1,29±0,14	————	————	————	————	————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Sel+ Selenyum Bağımlı

Grafik Ek9 : GLUTATYON PEROKSİDAZ
SELENYUM BAĞIMSIZ
(BEYİN SAPI)

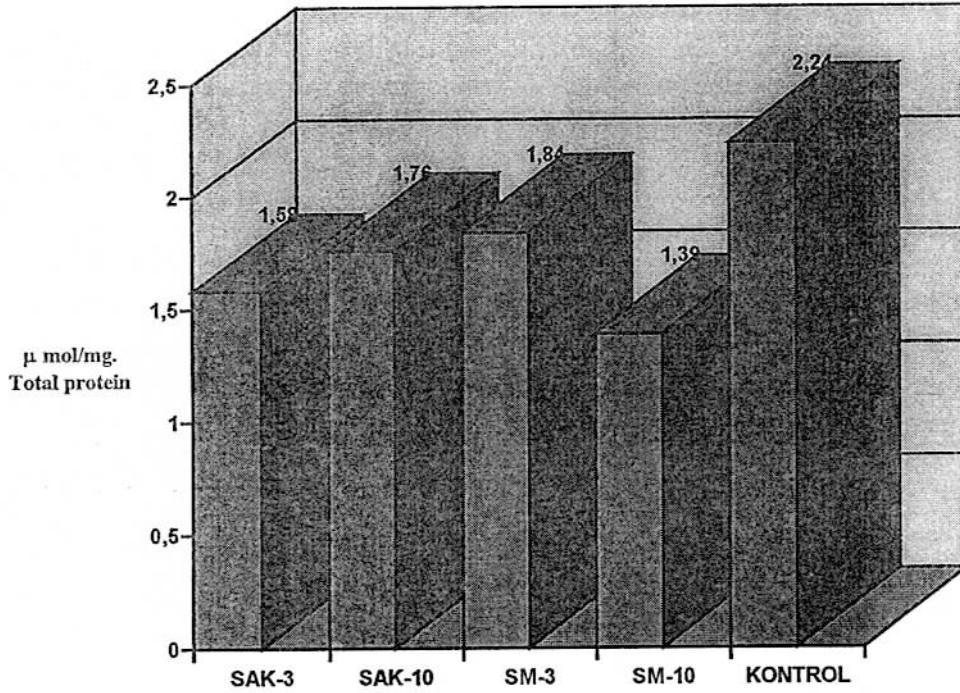


Tablo Ek 9 : GSH-Px (Selenyum bağımsız) Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Beyin sapı)

SH-Px (Sel-) Beyinsapı	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	2,4±0,19	2,13±0,3	1,89±0,19	1,11±0,22	1,55±0,36
SAK3 2,4±0,19	—————	P = 0,4418	P = 0,0830	***	P = 0,1304
SAK10 2,13±0,3	—————	—————	***	P = 0,0148	P = 0,1949
SM3 1,89±0,19	—————	—————	—————	P = 0,0207	P = 0,3823
SM10 1,11±0,22	—————	—————	—————	—————	P = 0,3282
KONTROL 1,55±0,36	—————	—————	—————	—————	—————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.
Sel- Selenyum Bağımsız

Grafik Ek10 : GLUTATON PEROKSİDAZ
SELENYUM BAĞIMSIZ
(SEREBELLUM)



Tablo Ek 10 : GSH-Px (Selenyum bağımsız) Enzim Aktivitesi İstatistiksel Değerlendirilmesi (Serebellum)

GSH-Px (Sel-) Serebellum	SAK3	SAK10	SM3	SM10	KONTROL
	1,58±0,11	1,76±0,32	1,84±0,39	1,39±0,31	2,24±0,26
SAK3 1,58±0,11	—————	P = 0,6454	P = 0,9591	***	P = 0,0650
SAK10 1,76±0,32	—————	—————	***	P = 0,3357	P = 0,2345
SM3 1,84±0,39	—————	—————	—————	P = 0,6126	P = 0,4418
SM10 1,39±0,31	—————	—————	—————	—————	P = 0,0541
KONTROL 2,24±0,26	—————	—————	—————	—————	—————

*** İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Sel- Selenyum Bağımsız