

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

RATLARDA KAFA TRAVMASINDA PROPOFOL VE
ERİTROPOETİNİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

738662

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
TEZ YÖNETİM MERKEZİ

Dr. Erdoğan ÖZTÜRK
UZMANLIK TEZİ

138662

TEZ YÖNETİCİSİ
Yrd.Doç.Dr. Semra DEMİRBİLEK

Malatya - 2002

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	2
2.1. Kafa Tavması	2
2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistemler	12
2.3. Eritropoietin	22
2.4. Propofol	32
3. Materyal ve Metod	43
4. Bulgular	51
5. Tartışma	57
6. Sonuç	65
7. Özet	66
8. Summary	67
9. Kaynaklar	68

1. GİRİŞ

Zamanımızın en önemli problemlerinden biri haline gelmiş olan kafa travmaları, öldürücü, sakat bırakıcı, uzun süre tedavi ve bakım gerektiren bir patolojidir¹. Travma sonrası normal fizyolojisi bozulan beyinde oluşan oksidatif metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılması, otonöregülasyonun da bozulması nedeniyle güçleşmektedir. Ayrıca, beyin oksidatif streslere karşı savunma mekanizmasının diğer organlara göre daha az olduğu bilinmektedir². Bu nedenle beyin antioksidan mekanizmalarının desteklenmesi gerekmektedir. Travmaya maruz kalan beyin, oksidantlara bağlı oluşan ikincil hasardan korunduğu oranda normal fizyolojisine dönebilir².

İntravenöz anestezi ajanı olan propofolün lipid peroksidasyonunu önleyerek beyin iskemik hasardan koruduğu belirtilmektedir³.

Hematopoetik bir hormon olan ve anemi tedavisinde kullanılan eritropoetin, beyin koruyucu özelliklerinin olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir⁴.

Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan kafa travmasında propofol ve eritropoetin antioksidan enzimlerden katalaz (CAT) ve süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi, oksidant bir enzim olan ksantin oksidaz (XO) aktivitesi, membran lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malon dialdehit (MDA) düzeyi ve nitrik oksit (NO) düzeyi üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAFA TRAVMASI

Araç içi ve dışı trafik kazalarına bağlı kafa travması, hem batı ülkelerinde hem de ülkemizde çocuk ve genç yetişkinlerin ölümlerinin en önemli nedenini oluşturmaktadır.

Beyin travmaya maruz kaldığında bir çok değişiklik meydana gelebilir (kommosyo serebri, epidural hematoma, subdural hematoma, intraserebral hematoma v.b.) fakat bir çoğunda küçük serebral arterler refleks olarak genişler ve intrakapiller basınç artar. Bu durum devam edince venüllerdeki basınçta artacağından arteriyel kapiller ağdan kan plazması intersellüler ve perivasküler mesafeye sızar. Aynı zamanda doku sıvısının absorpsiyonunda azalır. Bütün bunların sonucunda beyin dokusunda ödem gelişmesiyle, beyin hacmi artar. Kafatasının hacmi sabit olduğundan intrakraniyal basınçta artma olur. Intrakraniyal basınç artması, nabız sayısının yavaşlaması, arteriyel basıncın artması ile klinik olarak kendini belli eder. Basınç daha arttığında ise solunumun normal ritmi bozulur ve giderek düzensizleşerek apne gelişir.¹

2.1.1. DARBE SIRASINDA KAFA TRAVMASININ ŞİDDETİNE KATKIDA BULUNABİLECEK FAKTÖRLER:

1- Darbenin Kafadaki Etkileri: Skalp, kafatası ile yaralayıcı cisim arasında ezildiği için özellikle darbenin olduğu alanda skalp laserasyonuna daha çok rastlanır. Travma kafatasının tolerans sınırını aşarsa kafatası fraktürleri ortaya çıkar. Darbe alanı sınırlı bir alanda kalırsa büyük olasılıkla depresyon fraktürü meydana gelir. Darbe geniş bir alanı kapsıyor ve kafatasının distorsiyonu söz konusu ise lineer fraktür oluşma ihtimali daha fazladır. Tüm kafatası deforme olduğu zaman lineer fraktürler, kafatası kaidesine kadar uzanır¹.

2- İntrakraniyal Basınç Dalgaları: Kafa travması, ister künt ister penetran olsun darbe anında intrakraniyal basınç, 10-50 milisaniye gibi çok kısa bir süre içinde 1000-4000 mm Hg'ya ulaşabilir. Yaklaşık 1000 mm Hg düzeyinde; geçici şuur kaybı, arteriyel basınçta orta derecede yükselme, EEG'de kısa süreli bir supresyon ve bir anlık apne gözlenir. 1000-2000 mm Hg arasındaki basınçta; uzamış bilinç kaybı, arteriyel basıncın çok yükselmesi, EEG aktivitesinin uzun süreli kaybı söz konusuyken apne sürekli olma eğilimindedir¹.

3- Akselerasyon Ve Deselerasyonun Etkileri: Akselerasyon beynin, kafa travması sırasında kafatası içindeki hareketidir. Deselerasyon ise travma esnasında hareket eden beynin eski yerine dönme hareketidir. Akselerasyon ve deselerasyonun beyindeki başlıca etkileri üç tip yaralanma ile sonuçlanır. Bunlar; diffüz aksonal yaralanma, polar yaralanmalar ve köprü venlerinin kopmasıdır (bu durum en sık maksimal beyin hareketinin mümkün olduğu serebral atrofi hastalarda meydana gelir) ^{1,5}.

4- Travmatik Subaraknoid Kanama: Kafa travmalı hastada hemen her zaman görülür ve kendisini; baş ağrısı, ense sertliği, irritabilite gibi bulgularla gösterir^{1,5,6}.

2.1.2. KRANIYO-SEREBRAL TRAVMALAR

- 1-Skalp yaralanmaları
- 2-Kranyum fraktürleri
- 3-Kafa içi hasarlanmalar
 - a-Kommosyo serebri
 - b-Kontüzyon ve laserasyon
 - c-Epidural hematom
 - d-Subdural hematom
 - e-Intraserbral hematom
 - f-Beyin ödemi
- 4-Kranyumun penetran yaralanmaları
- 5-Enfeksiyon
- 6-Sık görülmeyen yaralanmalar
 - a-Arter yaralanmaları
 - b-Travmatik anevrizmalar
 - c-Travmatik kortiko kavernoöz fistül
 - d-Serebrospinal sıvı fistülleri
 - e-Pnömatosel
 - f-Leptomeningeal kist

Kafa travmalarının yukarıdakine benzer bir çok sınıflaması bulunmaktadır¹. Deneysel çalışmamızla ilişkisi olan konulara daha yakından bakacak olursak.

2.1.2.1. SKALP YARALANMALARI

Künt travmalarda ezilme ve sıyrılma şeklinde yaralanma olabileceği gibi şiddetli travmalarda parçalanma ve hatta kranyum üzerinden tamamen sıyrılma şeklinde ciddi yaralanmalar olabilir. En sık görülen skalp yaralanması laserasyon veya avuzyon şeklinde olmaktadır¹.

2.1.2.2. KRANYUM FRAKTÜRLERİ

Kafatası fraktürleri lineer, kommunike veya depresyon fraktürleri şeklinde olabilir. Fraktürlerin; üstünde uzanan bir laserasyonun varlığına veya fraktürlerin paranasal sinüslere yada orta kulağa uzanışına göre, açık veya kapalı fraktürler olarak daha ileri bir sınıflaması yapılabilir^{1,5}.

2.1.2.3. KAFA İÇİ HASARLANMALAR

1- Kommosyo Serebri: Travmadan hemen sonra kısa bir süre için şuur kaybıyla karakterize klinik tabloya kommosyo serebri denir. Bu, beyinde patolojik bir değişiklik olmadan, fizyopatolojik olarak beyin sapındaki uyanıklık durumunu idare eden retiküler formasyonun reversibl fonksiyon bozukluğu ile açıklanmaktadır^{1,5}.

2- Kontüzyon ve Laserasyon: Serebral kontüzyon ile laserasyon deyimleri arasında kesin bir sınır olmasa da, kontüzyon denilince; beyinde, sıyrıklar ve eziklerin yaygın olarak bulunduğu anlaşılır. Doku ve vasküler sistem yırtılmamıştır. Fakat kapiller staz oluşmuş BOS emilimi azalmış ve ödem meydana gelmiştir. Yer yer peteşiyel kanamalar görülebilir. Laserasyonda ise olay daha lokalize ve daha ciddidir. Damarlar yırtılmış ve beyin dokusunun bütünlüğü bozulmuştur. Beyin laserasyonunda sinir dokusu lezyonu geri dönüşümsüzdür ve hemen daima glial bağ dokusu oluşumu ile iyileşir^{1,5,6}.

3- Epidural Hematom: Epidural hematomlar genellikle düşük hızlı künt travmalara bağlıdır. Duramaterin dış yüzeyi ile kafatasının iç yüzeyi arasındaki kanama hemen her zaman lokalize kafatası kırığından sonradır. Epidural hematomda hastaların travma sonrası bilincini tamamen kaybetmeyen kısa süreli komaya giren ve toparlanan veya hasardan sonra devam eden komatöz halleri olur. Epidural hematomun yarısından fazlası serebral hemisferin konveksitesinde arteriya meningeal media ve dallarının beslediği bölgelerde görülür. Bunlar kafatası kırıklarında en çok yaralanan ve kanamanın kaynağı olan

damarlardır. Şu hatırlanmalıdır ki epidural hematomun %10'u frontal bölgede veya posteriyor fossada ortaya çıkar. Posteriyor fossadaki hematomlar çok önemlidir, çünkü hematom oluşumunun çok ileri evrelerine kadar hasta bilinçli kalabilir ve sonra kendiliğinden bilincini kaybeder, apneik olur ve birkaç dakika içinde ölür. Muhtemeldir ki posterior fossadaki epidural kanamaların çoğu supratentorial alana yayılır ve transvers sinüse boşalan duraya bası yaparak boşalmasına engel olur, böylece zor bir kanama odağı oluşturur. Bütün vakalardaki hematomun katı pıhtılaşmış kandan oluşması kraniyotomiye gerekli kılar. Hematomun klinik tablosu klasik olarak; kısa süreli bir şuur kaybı periyodu, bunu takiben bir lüsid interval ve daha sonra şuur kaybı ile fokal bulguların ortaya çıkmasıdır. En erken bulgular, ipsilateral pupilin dilate olmaya başlaması, bunu takiben internal ve eksternal okülomotor sinir paralizisi ve şuur düzeyindeki hızlı bozulmadır^{1,5,6}.

4- Subdural Hematom: Subdural hematom, kanın dura mater ile araknoid membran arasındaki subdural mesafede toplanmasıdır. Subdural hematomların büyük çoğunluğu venöz orjinlidir^{1,5,6}.

Akut subdural hematomlar, kural olarak bir post travmatiktir ve beynin hareketi ile bağlantılı lezyonlardır. Duranın iç yüzeyi ile beynin yüzeyi arasında bir köprü yapan bir venin rüptürü veya beynin yüzeyindeki küçük bir arterin rüptürü ile oluşabilir, bunlar kafatası kırığının varlığında sıkça görülmelerine rağmen kırık yeri subdural hematomun karşı tarafında olabilir. Beyinde hemorajinin en sık kaynağı, genellikle patlamaya hazır lob olarak adlandırılan temporal lobun temporal polünün laserasyonu olabilir^{1,5,6}.

a- Akut Subdural Hematom: Akut subdural hematomlu bir hastanın hikayesi epidural hematomdan farksızdır. Bu hematomların gelişimi daha hızlıdır, çoğu vakada büyük köprü venlerinden biri açılmıştır⁶.

Post travmatik orta hat kaymasına, genellikle akut subdural hematom neden olur ki bunun nedeni hematomun kitle etkisi mi yoksa travma ile orta hattın kayması mı olduğu bilinmemektedir^{1,5,7,8}.

b- Kronik Subdural Hematom: Kronik subdural hematom biraz daha farklıdır. Ana olarak yaşlılarda, gençlerde ve primer beyin atrofisi olanlarda görülür ve haftalar içinde gelişir, hematom sıvı kan ile doludur. Bazı vakalar birkaç hafta öncesinde hafif kafa travması öyküsü verir ancak, vakaların önemli bir bölümü travmayı hatırlamayabilir^{1,5,6}.

5- İntraserebral Hematom: Kafa travması sonrası beyin dokusu içinde 5 mm çapına kadar olan kanamalar peteşial veya punktat lezyonlar olarak tanımlanırken bundan büyük lezyonlar intraserebral hematom olarak kabul edilir. Büyük intraserebral hematomlar, beynin frontal ve temporal bölgelerinde bulunur. İntraserebral hematomlar, kurşun yaralanmaları, perfore yaralanmalar ve depresyon fraktürleri gibi darbenin, kafanın nispeten küçük bir bölgesine isabet ettiği vakalarda görülür . Uzun süreli antikoagülan tedavi alan hastalarda çok küçük kafa travmasından sonra bile çok ciddi intraserebral hematom gelişebilir^{1,5,6}.

2.1.3. BEYİN ÖDEMİ

Akut kafa travması serebrovasküler dolaşımdaki otheregölasyonu bozarak lokal ya da bölgesel bir ödem gelişmesine yol açar. Beyin ödeminin bir çok fizyopatolojik tanımlamaları yapılmıştır: vazojenik ve sitotoksik ödem⁹, hidrostatik ödem^{10,11}, interstisyel ödem¹¹, osmotik ödem¹¹. Burada kan beyin bariyerini yakından incelemek gerekmektedir.

2.1.3.1. KAN-BEYİN BARIYERİ (KBB) FİZYOLOJİSİ

KBB, beynin ekstraselüler ortamının sıkı bir şekilde düzenli olmasını sağlayan sistemdir. Nöronların elektrofizyolojik güçlerini sürdürebilmeleri için elektrolit dengesinin sabit tutulması gerekmektedir. Beynin özel yapıdaki endotelî iyon tranportunu ve beyin fonksiyonları için gerekli metabolitlerin iki yönlü hareketini yönetme yeteneğine sahiptir. Dolaşımla beyin dokusu arasındaki iyon, metabolik maddeler ve sıvı değişimi esas olarak kapillerler boyunca yapılmaktadır. Az

miktarda küçük venüller ve arterioller düzeyinde de olabilir¹². Mikrovasküler KBB'nin ultrastrüktürel yapısı incelendiğinde endotel hücreler pentalaminar sıkı bağlantılar, devamlı kapiller bazal membran, endotelial hücrelerin mikropinositik aktivitelerinin kısıtlılığı, endotel hücrelerinin bol miktarda mitokondria içermeleri, endotel hücrelerinde fenestrasyonların olmaması, kapiller bazal membranların astroglial uzantılarla sıkı şekilde desteklenmiş olduğu gözlenmektedir¹³. Ayrıca endotel hücreleri içindeki vezikül sayısı diğer hücrelere göre düşüktür. Serebrovasküler endotelin geçirgenliğinin çok düşük olduğunu gösteren en önemli özellik hücreler arası sıkı bağlantı ve vezikül sayısının az olmasıdır. Beyin kapiller endotel membranı yarı geçirgen bir lipid membran olarak işlev görür, böylece yağda eriyen moleküllerin ve O₂, CO₂ gibi gazların geçişine izin verir. Buna karşın polar maddeler ve büyük maddeler geçemezler. Maddelerin beyine pasif difüzyonla geçişi; maddelerin moleküler boyutları, elektrik yükleri, yağda eriyebilme gibi kimyasal özelliklerine bağlıdır. Bir maddenin yağda eriyebilir olması onun KBB'nden geçmesini sağlayan en önemli kimyasal özelliğidir. Yağda eriyebilirlik su-yağ dağılım katsayısı ile ölçülebilir. Aminoasitler, glikoz, biyolojik aminler ve diğer esansiyel besinler membran transporterleri olarak bilinen bir sistemle KBB'nden geçebilirler^{14,15}. Beyindeki kapiller endotelindeki transportta görevli taşıyıcı moleküllerin ve membrana bağlı enzimlerin dağılımında, belirgin bir şekilde apikal-bazal fark vardır. Son çalışmalar beyin endotelindeki porların açık olmadığı, fakat c-AMP (siklik adenosin 3'-5' mono fosfat), c-GMP (siklik guanozin 3'-5' monofosfat), protein kinaz C ve araşidonik asit gibi sekonder haberci sistemler aracılığı ile uyarılabileceğini göstermiştir. Yine impermeabilitenin devamlılığının, Ca⁺⁺ protein kinaz II'ye bağımlı Ca⁺⁺/kalmodülin olabileceği de ileri sürülmüştür. Bu da beyin endotelinin fizyolojik olarak da açılabilceğini telkin ederken henüz tam açıklığa kavuşmamıştır¹⁴. Herhangi bir kafa travmasından sonra ortaya çıkan serebro-vasküler permeabilitenin artışı şu mekanizmalarla açıklanabilir¹⁴.

- Endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantıların (tight junction) kesintiye uğramaları ve ayrılmaları
- Veziküler transportun artması
- Transendotelial kanalların veya porların genişlemesi
- Endotel hücre membranlarının biyokimyasal veya yapısal değişikliği.

2.1.3.2. ÖDEM ŞEKİLLERİ

1- Vazojenik ödem: KBB bütünlüğünün bozulmasıyla damar içi hidrostatik basınç, plazma ve türevlerini hücreler arası boşluğa sürükler. Bu geçiş suyuda beraberinde taşır. Birikim daha çok beyaz cevherde olur. Oluşma-yayıma,dengelenme ve çözülme olarak üç dönemi vardır⁹.

2- Sitotoksik veya sellüler ödem: iskemiye takiben sinaptik aralıkta biriken eksitatuvar aminoasitlerin ilgili reseptörleri aşırı uyarmasıyla gliyal hücre membranında bulunan Na^+/K^+ iyon pompası durmakta ve hücrede Na^{++} ve Ca^{++} birikimi olmaktadır. Na^{++} 'u su izlemekte ve Ca^{++} artışıda hücre içinde destürüktif mekanizmaları harekete geçirmektedir. Sonuçta gliyal hücre zarında iyon alışverişi durmasını takiben hücreler arası boşlukta Na^+ ve su birikmektedir^{10,11}.

3- İntersitisyel ödem: Hidrosefalide ventrikül içi basınç, doku basıncından yüksektir ve basınç farklılığı nedeniyle BOS, ependimden periventriküler beyaz cevherdeki hücreler arası alana geçer. Vazojenik ödemden ödem sıvısının BOS özelliğinde olması ve KBB'nin sağlam olmasıyla ayrılır¹¹.

4- Hidrostatik ödem: Sistemik hipertansiyon ve serebroventriküler oteoregülasyonun bozulması sonucu oluşur¹¹.

5- Osmotik ödem: Plazma ozmolaritesi çeşitli nedenlerle düşerse artan ozmotik basınç farkıyla su beyin dokusuna geçer ve ödem gelişir¹¹.

Bugün periferik dolaşımdaki permeabilite defektlerinin kimyasal araçlarla gerçekleştiği bilinmektedir. Kimyasal mediatörlerin, endotelial fonksiyonlar üzerine direkt etkilerinin yanı sıra, vazomotor etkinlik de

gösterdikleri bilinmektedir. Serebral hipoksi, iskemi ve travmalar gibi bir çok beyin hasarlanmasında, araşidonik asit salınımı gerçekleşmektedir. Bunun da en az iki yolla serebral ödem gelişiminde rol aldığı bilinmektedir^{14,15}. İlk olarak araşidonik asit öncelikle amfolitik (asit ortamda baz, bazik ortamda asit gibi davranabilen) özelliği nedeniyle fosfolipid tabakaya hızla girmektedir ve bu membranın özelliklerini değiştirebilmektedir. İkinci olarak da endotele lökosit adezyonu ve penetrasyonunu artırmakta bu da endotelin zedelenmesine neden olmaktadır. Araşidonik asit metabolitleri, özellikle de lökotrienler, KBB fonksiyonu bozukluklarında potansiyel mediatörler olarak bilinmektedir¹⁴. Aynen araşidonik asit gibi KBB üzerine olan etkilerini, vazomotor regülasyonu direkt etkileyerek, lökositleri aktive ederek veya lökositlerin endotele yapışmasını artırarak ya da direkt olarak endotelial permeabilityyi artırarak gerçekleştirebilir^{14,15}.

Bradikinin, plazma proteazlarına ait kinin sisteminin önemli bir komponentidir ve KBB fonksiyonunu etkilemektedir^{14,16}. Bradikinin serebrovasküler permeabilityyi, büyük molekülü maddelere ve suya karşı artırmakta ve güçlü bir arteriyel dilatör olarak görev yapmaktadır. Bu etkisini sıkı bağlantıları açarak yaptığı düşünülmektedir¹⁴.

Vazoaktif aminlerden histamin ve serotonin de permeabilityyi artırıcı ve vazodilatör etkiye sahiptir. Bu aminlerin hücrel kaynakları, damar duvarı, nöronlar, mikrogliya ve perivasküler mast hücreleridir^{14,16}. Histaminin KBB'nin fonksiyonunu bozduğuna dair bilgiler yetersizdir¹⁷.

2.1.4. İKİNCİL HASARIN BEYİN ÜZERİNE ETKİLERİ

Kafa travması sürecindeki olayların birden fazlası genellikle aynı anda olur ve intrakraniyal olarak birbirlerine karşı etkileri karmaşık olabilmektedir. Bu olayların çoğu, intrakraniyal basıncın artması ile sonuçlanır. İntrakraniyal bir kompartmanla diğeri arasında farklılık ortaya çıkar ise beyin şiftileri ve herniasyonların görülme ihtimali mevcuttur. Beyin perfüzyon basıncı, intrakraniyal basıncın artması veya

sistemik arteriyel basıncın azalması nedeniyle düşebilmektedir. Sonuçta serebral dolaşım zarar görebilmektedir. Eğer sistemik hipoksi mevcutsa beyin oksijenasyonunun daha fazla tehlike altında olduğu söylenebilir. Otopsilerde en sık görülen sekonder lezyonun hipoksik/iskemik beyin hasarı olması sürpriz olmamalıdır¹⁸.

Beyindeki hasarın tipine yoğunluğuna ve resüsitasyonun başarısına bağlı olarak otodestruktif nörokimyasalların ve enzimlerin aktivasyonu, nekroz, apopitoz, kan beyin bariyerinin bozulması, ödem oluşması, serbest radikallerin üretilmesi ile inflamatuvar eksitotoksik hücre hasarı oluşabilir^{7,8}. Sonuçta patoloji kontüzyonlar, hematomlar ve yaygın aksonal hasar olarak ortaya çıkabilir. Primer beyin hasarıyla birlikte damarlarla ilişkili hasarlar da meydana gelebilir. Primer hasarın tipine göre iskemi global veya fokal olabilir. Beyin bir kez hasar görünce, çok kısa bir dönem iskemik kalsa bile önemli fizyolojik değişiklikler görülebilir. Beyin kan akımı çalışmaları ve juguler bulb desatürasyonu verileri, toparlanma fazında geçici iskemik ataklar görülebileceği ve bunların kafa travmasının sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebileceğini düşündürmektedir⁹. Hipotansiyon ve mortalite arasındaki pozitif korelasyon, iskemik komplikasyonların sonuçları etkilediğini düşündürmektedir¹⁷.

Demopulos ve arkadaşları santral sinir sisteminin serbest oksijen radikallerine karşı duyarlı olmalarının bazı nedenlere bağlı olduğunu bildirmiştir¹⁹. Bu nedenler:

1-Santral sinir sistemindeki hücrelerin membran lipidleri doymamış yağ asitleri ve kolesterolden zengindir. Bu nedenle serbest radikallere karşı duyarlıdır. Ayrıca beyin radikallere karşı koruyucu enzimlerden yoksundur.

2-Beyinde demir konsantrasyonu yüksektir ki bu da serbest radikal oluşumunu artırıcı bir özelliktir.

Serbest oksijen radikal oluşumu başladıktan sonra kendiliğinden yayılan bir olaydır. Bu olay demir varlığında daha da şiddetlenmektedir^{18,19}.

2.2. OKSİDAN VE ANTIOKSİDAN SİSTEMLER

2.2.1. SERBEST RADİKALLER

Oksijen dünyada en çok bulunan maddedir. Oksijen; travma, ödem, oklüzyon gibi dokuda beslenme ve dolaşım bozukluğu meydana getirebilen durumlarda doku tarafından üretilen bazı metabolitlerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türleri (ROS) olarak anılan serbest oksijen radikali (SOR) oluşturmaktadır. Bu serbest oksijen radikalleri dokuda daha fazla hasar meydana getirebilmektedir²⁰.

Serbest radikal bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren bir maddedir. Bir veya birden fazla çiftlenmiş elektron bulunması o maddenin magnetik bir alana çekilmesine neden olur ve bazen o maddenin son derece reaktif olmasına yol açar²¹. Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar²¹.

Serbest radikallerin hücrel hasar yaptığı bilinen en iyi örnekler^{20,21};

- 1-Pulmoner oksijen toksisitesi
- 2-Post iskemik reperfüzyon hasarı
- 3-İnflamatuvar olaylar
- 4-Radyasyon hasarı
- 5-Bir çok kimyasalın toksik etki göstermesi
- 6-Alzheimer hastalığı
- 7-Diyabetes mellitus (DM)
- 8-Ateroskleroz
- 9-Yaşlanma
- 10-Karsinogenezis
- 11-Göz hasarı vd.

2.2.1.1. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ÇEŞİTLERİ

2.2.1.1.1. OKSİJEN TÜREVİ SERBEST RADİKALLER

1- Süperoksit Radikali (O_2^-): Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanması, onu redükleyerek süperoksit serbest radikal anyonunu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak O_2^- kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Milisaniyalik bir yarı ömürle zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır. O_2^- oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi buna karşı organizmayı korur. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması, geçiş metal iyonlarını redüklemesi ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmalarıdır^{22,23,24}.

2- Hidroksil Radikali (OH^-): OH^- biyomoleküler sistemlerde bulunan en güçlü radikaldir. Hidrojen peroksitin geçiş metallerinin iyonları varlığında parçalanmasıyla oluşur. Anlatılan reaksiyon Fe^{++} katalizli Haber-Weiss (fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + OH + Fe^{3+}$). Hidroksil radikali, hemen hemen bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen reaktivitesi yüksek olan bir ajandır. Fakat başlıca etkileri; lipitler, proteinler, sitokromlar ve nükleik asitler (DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşturur) üzerine olan etkileridir. Çok kısa ömürlü olduğundan reaksiyona girmeden önce hücreden difüzyonu güçtür, fakat küçük miktarları bile üretildiği yerde aşırı hasar yapabilecek kapasitededir^{21,22,23}.

3- Hidrojen Peroksit (H_2O_2): O_2^- 'nin dismutasyon reaksiyonu ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) veya direkt olarak oksijenin indirgenmesiyle ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) meydana gelir. H_2O_2 son derece güçlü bir oksitleyici ajan olmasına karşın yavaş reaksiyon verir. Fazla reaktif değildir, oluşturduğu hasar protein tiyollerini oksitleme ve DNA'da zincir kırılmaları meydana getirme özelliği ile. Asıl önemi, geçiş metal

iyonlarının varlığında hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. H₂O₂ ile oluşturulan hasar katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri aracılığı ile önlenir^{21,22,23,25}.

4- Hipokloröz Asit (HOCl) : Aslında bir radikal olmamasına rağmen SOR içinde yer almaktadır. HOCl fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynar. Aktive edilen monositler, nötrofiller, eozinofiller ve tüm makrofajlar O₂ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde çok önemlidir. Özellikle nötrofiller içerdikleri miyeloperoksidaz (MPO) enzimi ile O₂'nin dismutasyonu sonucu oluşan H₂O₂ molekülünü, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür. $H_2O_2 + Cl \rightarrow HOCl + OH^{-26}$.

5- Singlet Oksijen (singlet O₂): Oksijen molekülünün daha reaktif türü olan singlet O₂'ler moleküler oksijenin enerji almasıyla meydana gelirler. Bunların delta ve sigma olmak üzere iki tipi mevcuttur. Sigma tipi daha reaktif olduğu için hızla delta tipine dönüşür. Bu yüzden biyolojik sistemlerde delta tipinden bahsedilir²⁷.

2.2.1.1.2. OKSİJEN TÜREVİ OLMAYAN SERBEST RADİKALLER

Nitrik Oksit (NO) : NO, bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftlenmemiş elektron vererek birleşmesinden oluşmuştur²⁵. Bir serbest radikal olan NO, kolaylıkla biokimyasal reaksiyonlara giren ve biyolojik membranları hızla geçebilen çok kısa ömürlü (6-10 saniye etki gösterir) bir gazdır. Oksijen ve su tarafından nitrat ve nitritlere dönüştürülür veya süperoksit ile birleşerek peroksiti oluşturur. Bütün memeli hücrelerinden sentezlenebilen NO; kan basıncının düzenlenmesinden, sinirler arası iletişime ve savunma sistemine kadar pek çok fizyolojik olayda anahtar molekül olarak rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlenir. Sentezlenen nitrik oksit, damar düz kas hücrelerine geçerek vazodilatasyon yapar ve serebral kan akımının düzenlenmesini sağlar. Makrofaj, lenfosit ve nötrofillerdeki NO ise immün ve inflamatuvar cevapların önemli bir elemanı olarak rol alır³⁷⁻³⁸. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol

gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NOS'lar başlıca, yapısal (constitively) NOS (cNOS) ve uyarılabilen (inducible) NOS (iNOS) olarak iki gruba ayrılır. cNOS normalde hücrede yapısal olarak sentezlenir ve başlıca kan basıncının düzenlenmesinden ve nörotransmisyonundan sorumludur. Oysa iNOS lipopolisakkarid ve interferon- γ ile indüklenmekte, çok yüksek ve toksik miktarda NO sentezini katalizlemektedir. cNOS başlıca endotelial hücrelerde ve nöronlarda bulunur, kalsiyum/kalmodülün ile aktive edilir. iNOS ise makrofajlarda ve damar düz kaslarında bulunur, kalsiyum/kalmodülinden bağımsızdır²⁸.

2.2.1.2. SERBEST RADİKAL ÜRETİM KAYNAKLARI

Normal şartlar altında SOR üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. İskemi yaratan olaylarda (ödem, damar hasarı, damar oklüzyonu) SOR'ların üretimi artmaktadır. Serebral iskemide rol oynayan SOR'lar; O_2^- , NO, peroksinitrit ve OH^- 'dir²⁹.

1- Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri: Süperoksit radikalinin invivo en önemli kaynağı bir çok aerobik hücrelerde mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zinciridir. Mitokondriyal oksijen tüketip enerji ürettikleri için SOR'nin en çok üretildiği yerdir¹⁴. Mitokondrinin en önemli görevi Krebs döngüsü esnasında üretilen indirgenmiş $NADH+H^+$ ve indirgenmiş $FADH_2$ 'nin oksidasyonu, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve diğer metabolik olaylardır. Mitokondriyal elektron transport zincirinde normal şartlarda bir molekül oksijene dört elektron aktararak iki molekül su oluşturulur ($O_2+4H^++4e^- \rightarrow 2H_2O$). Mitokondrideki elektron taşıyıcılar büyük oranda redüklendiğinde elektron akımının %2'si oksijenin tek bir elektronla redüksiyonuna yol açar; bu da süperoksit meydana getirir. Bu durum, solunum zincirinin nispeten redükte duruma geçtiği fokal ve global iskemilerde oluşmaktadır³⁰.

2- Ksantin Oksidaz (XO) Aktivasyonu: XO sistemi, dokuların beslenme bozukluğundaki en önemli SOR üretim kaynaklarından biri

olarak kabul edilir. Herhangi bir nedenle oluşmuş doku iskemisinde ATP ve adenin nükleotidlerinin yıkımı ile 10 dakika içinde hipoksantin birikir³¹. Oluşan hipoksantinde, XO veya ksantin dehidrogenaz (XDH) tarafından metabolize edilir. Bunlardan XDH elektronları NAD'ye transfer ederken, XO akseptör olarak oksijeni seçer ve süperoksit oluşturur. Hipoksik şartlar, XDH'nın XO'ya çevirimini katalizleyen proteolitik enzimleri de aktive ettiği için iskemide XO seviyesi artar ve dokuda dolaşım yeniden başlayınca bu bölgeye oksijen geldiğinde birikmiş olan hipoksantin, ürata okside edilir. İşte bu reaksiyonda moleküler oksijen de süperoksit radikallerine çevrilir. XO'nun çoğu endotel hücrelerinde bulunmakla birlikte salgılanan XO'nun kan dolaşımıyla vücudun her tarafına dağıldığı gösterilmiştir³².

3- Fenton Reaksiyonu: Beynin bazı bölgelerinde demir içeriği oldukça yüksektir. Beyinde bulunan demirin çoğu HEM enzimlerindedir veya ferritine bağlıdır. Muhtemelen iskemik alandaki düşük pH veya Fe^{+3} 'ün süperoksite bağlı redüksiyonu ile demir bu proteinden ayrılır ve serbestleşmiş demir üç katına çıkar³³. Serbest demirdeki artış demirin rol aldığı Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu ile OH radikali üretimini artırmaktadır²⁵.

4- Endoplazmik Retikulum: Endoplazmik retikulum başlıca sitokrom P-450 olarak bilinen sitokromları içerir. Sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak bir çok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu nedenle mono-oksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak da adlandırılır. Kimyasal maddelerden serbest radikal oluşmasında en önemli mekanizma, ksenobiyotiklerin mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem moleküllere bir elektron ilavesiyle (indirgenme olayı; karbon tetraklorür ve halotanda olduğu gibi) veya molekülden bir elektron çıkararak (oksidasyon olayı) serbest radikal oluşturur³⁴.

5- Redoks Döngüsü: Bu reaksiyonlar sitokrom p-450 gerektirmez. Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal

reaksiyonlarla olmamaktadır. Menandion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, adriamisin, bleomisin ve furosemid gibi bileşikler alternatif bir redoks döngüsüne girerler. Bu bileşikler ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikal tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve sonuçta O_2^- oluşur²⁶.

6- Araşidonik Asit Metabolizması: Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Doku iskemisine bağlı olarak ATP'nin azalması sonucu hücre içi ile dışı arasında elektrolit dengesini sağlayan kanalların yapısı bozulur. Sonuçta hücre membranından içeriye Ca^{++} iyonu girerek inaktif litik enzimleri aktive eder (fosfolipaz A_2 ile protein kinazın gibi) ve hücre membranındaki fosfolipidlerin parçalanmasıyla başta araşidonik asit olmak üzere yağ asitleri birikimine yol açar. Araşidonik asit de siklooksijenaz (COX) veya lipooksijenaz enzimleri aracılığı ile prostoglandinleri ve lökotrienleri oluşturmaktadır. Biriken araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu ile serbest radikal ara ürünler O_2^- meydana gelmektedir³⁵.

7- Nötrofil Akümülayonu ve Aktivasyonu: Travma sonrası dokuda oluşan damar hasarı sonucunda nötrofiller damar endoteline yapışarak bir miktar parankime sızarlar. Nötrofillerin membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi, çevreden sağlanan moleküler oksijeni O_2^- dönüştürür. Nötrofillerde oluşan O_2^- 'den, daha sonra süperoksit dismutaz (SOD) etkisiyle H_2O_2 oluşturulur. Miyeloperoksidaz (MPO) varlığında H_2O_2 de HOCl'e dönüşür³⁵.

8- Monoamin Akümülayonu: Sıçanlarda 15 dakika süren global iskemiden beş dakika sonra biriken katekolaminlerden monoaminooksidaz (MAO) aracılığı ile H_2O_2 üretildiği gösterilmiştir. Fakat MAO'nun bloke edilmesi hasarı azaltmamıştır. Bu durum erken H_2O_2 üretiminin hasar meydana getirmedeğini göstermektedir³⁵.

9- NO ve Peroksinitrit ($ONOO^-$) Üretimi: Serebral iskemiden sonra hücre içindeki Ca^{++} düzeyi artar. Bu durumda Ca^{++} /kalmodülin bağımlı

NOS'un aktivasyonunu artırarak NO üretimine yol açar. nNOS ve iNOS'un her ikisi de fokal iskemiden sonra aktivitelerini artırır. Bununla birlikte iNOS aktivitesi glia hücrelerinde global iskemiden bir iki gün sonra artar. O_2^- ve NO birleşerek ONOO⁻ meydana getirirler. Bu reaksiyonun hızı yüksek olduğu için ONOO⁻ hızlı oluşur ve NO çok aktif olan SOD ile O_2^- için yarışır³⁵.

10- Mitokondri Dışında Serbest Oksijen Radikali Üreten Kaynaklar

1- COX, XO ve NADPH-oksidad: Beyin parankiminde ana oksidan olarak O_2^- oluştururlar.

2- MPO ve MAO: Bunlar lökositlerde ve beyin parankim hücrelerinde HOCl ve H₂O₂ üretirler.

3- NOS enzimleri: Çeşitli hücre tiplerinde NO radikalini oluştururlar. Beyinde hasar oluşturacak serbest radikal üretimi için en kuvvetli mekanizma, mitokondriyal elektron transport zinciri ve XO yoludur³⁵.

2.2.1.3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNE KARŞI KORUYUCU SİSTEMLER

Organizmada oluşan oksijen radikalleri ile koruyucu sistem olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin radikaller lehine kayması oksidatif stres olarak adlandırılır. Hücreleri oksidatif streslere karşı koruyan antioksidan sistem enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır³⁵.

Hücresele seviyede etkili olan enzimatik sistemler: SOD, CAT, GSH-Px ve selenyum bağımsız GSH-Px olan glutatyon S-transferazdır (GST). Ayrıca glutatyon redüktaz (GSHrd) ve glukoz-6-fosfat dahidrojenazda (G6PD) bu sistem içinde bulunmaktadır.³⁵

Nonenzimatik sistemler; glutatyon, N-asetil sistein, vitamin C, A, E, metalloitiyonin ve tiyoller gibi protein olmayan sülfidrilere dir³⁵.

2.2.1.3.1. ENZİMATİK OLAN ANTIOKSİDANT SİSTEMLER

1- SOD: Bakır (Cu)-çinko (Zn) içeren, mangan (Mn) içeren ve demir (Fe) içeren alt tipleri vardır. Cu-Zn SOD enzimi O_2^- detoksifikasyonunda

anahtar bir enzimdir. $O_2^{\cdot-}$ 'ni H_2O_2 'e dönüştürür ($2O_2^{\cdot-}+2H^+ \rightarrow H_2O_2+O_2$). Mn-SOD enzimi başlıca mitokondri matriksinde yerleşmiştir. Ayrıca mitokondri dışında da bulunur. Fe-SOD dismutasyon reaksiyonunu yürütür, ama diğer SOD'lara göre daha yavaş oluşur^{25,35}.

2- CAT: H_2O_2 biyolojik sistemler için zararlıdır ve HO^{\cdot} oluşumunu artırmaktadır. Bu nedenle H_2O_2 'in uzaklaştırılması gerekmektedir, bunu yıkan enzim CAT'dır ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). CAT, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Doku CAT aktiviteleri çok farklılık göstermektedir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanmıştır³⁵.

3- Selenyum Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (Se-GSH-Px): Prostetik grup olarak Se taşımaktadır. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. Aşırı H_2O_2 varlığında indirgenmiş (redükte) glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu katalize eder ve bu arada H_2O_2 de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur³⁶. ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$)

4- Glutasyon Redüktaz (GSHrd): GSH-Px tarafından H_2O_2 veya diğer lipid peroksitlerin indirgenmesi sırasında GSH GSSG'a dönüşüyordu. Bu okside formun tekrar redükte forma dönüşerek reaksiyonlarda kullanılması gerekmektedir. Çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. İşte GSH enzimi NADPH varlığında bu indirgeme olayını yürütmektedir³⁵. $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$

5- Glutasyon S-Transferaz (GST): Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan etkinlik gösteriler. Üçü sitozolik biri de mikrozomal olmak üzere dört alt tipi vardır³⁵.

2.2.1.3.1. NON ENZİMATİK ANTIOKSİDAN SİSTEMLER

1- GSH: GSH'nun H_2O_2 yıkan enzimler olan Se-GSH-Px ve dehidroaskorbat redüktaz enzimlerinin substratı olduğu daha önceki konularda anlatılmıştı. Bunlara ek olarak GSH, HO^{\cdot} ve singlet O_2

temizleyicisidir. Bir çok hücrede yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalarak inaktif olmuş bazı enzimleri rejenere edebilir. GSH eksikliği hayvan hücrelerinde hemoliz gibi ciddi sonuçlar doğurabilir^{25,35}.

2- C Vitamini (Askorbik Asit): Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketalaktondur. Güçlü indirgeyici özelliğinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. O_2^- ve HO^- ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C Vitaminin bir diğer özelliği de antioksidan etkisinin yanı sıra oksidan etki göstermesidir. C Vitamini, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen O_2^- dışındaki tek hücrenel ajandır³³. Askorbik asit düzeyinin düşük olması tüm kronik inflamatuvar hastalıklarda ve lipit peroksidasyonunun arttığı durumlarda önemli rol alır. Diyetle C vitamini alımının akut sigara içimi ile oluşan düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Oksidatif stres altında reaktif moleküller çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, inflamasyona, koruyucu enzimlerin inaktivasyonuna ve lenfosit proliferasyonunun inhibisyonuna sebep olurlar. C vitamini, reaktif bakterisidal moleküllerin hücre içi konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller³⁷.

3- E Vitamini: α , β , γ ve δ olarak dört tokoferolün karışımıdır. α -tokoferol doğada en fazla bulunan ve biyolojik etkisi en fazla olan tokoferoldür. Antioksidan etkisi en fazla olan α -tokoferoldür. Yapısındaki hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur. En yüksek E vitamini konsantrasyonu, mitokondri ve mikrozom gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunur. Miyokard membranındaki miktarı da fazladır. Hücre membranındaki fosfolipitlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma elemanıdır. Bir molekül E vitamini 100 molekül yağ asiti peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini O_2^- , HO^- , singlet O_2 , lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri temizler. α -tokoferol etanol, karbon tetraklorür, dikuat, parasetamol, kalsiyum deşarjı ve diğer uyarıcılarla oluşan hepatosit

peroksidasyonunu inhibe eder. Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemisinde E vitamini seviyesinin azaldığı, reperfüzyonda ise dışardan verilen E vitamininin peroksidatif hasarı önlemede yardımcı olduğu gösterilmiştir³⁷.

4- Karotenoidler: A vitamininin ön maddesi olan β -karoten, bitkilerdeki kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü singlet O_2^- temizleyicisi olup ayrıca HO^- , peroksit ve alkol radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebilir³⁵.

5- Ürik Asit: Singlet O_2 , peroksit radikalleri (RO_2), HO^- , ozon, ve $HOCl$ için güçlü bir temizleyicidir ve invivo antioksidan olarak kabul edilmektedir. Japon araştırmacılar lipid peroksidasyonunun ürik asitle önlendiğini bildirmiştir³⁵.

6- Desferoksamin (DFO): Bu şelatör ajan başlıca demir için spesifiktir, ancak az miktarda diğer metalleri de bağlayabilir. DFO, Fe^{+3} 'ü bağlar ve oluşan kompleksteki demiri indirgemek oldukça zordur. Demir bağımlı H_2O_2 'den HO^- oluşumunu inhibe eder. Peroksit radikalleri için de iyi bir temizleyicidir, kalp, deri, barsak ve böbrekte iskemi sonrası reoksijenasyon hasarını oluşan HO^- 'ini temizleyerek önlemektedir²⁵.

7- Melatonin: HO^- temizleyen güçlü bir antioksidandır. Günümüze kadar bilinen en potent antioksidandır. Lipofilik bir madde olduğu için kan-beyin bariyeri de dahil bir çok kompartmana girerek geniş bir antioksidan özellik gösterir, bu diğer antioksidanlara karşı bir üstünlüktür³⁵.

8- Sistein: O_2^- ve HO^- temizleyicisidir³⁵.

9- Albümin: Cu iyonlarını sıkı bir şekilde bağlar ve Cu bağımlı lipid peroksidasyonunu ve HO^- oluşumunu inhibe eder. Albümin aynı zamanda etkili bir $HOCl$ temizleyicisidir^{25,35}.

10- Serüloplazmin : Cu içeren protein olan serüloplazmin Fe^{+2} 'i Fe^{+3} 'e yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe eder. İnsan plazmasının antioksidan aktivitesinin önemli bir bölümü serüloplazmin nedeniyledir³⁵.

11- Haptoglobülinler: Haptoglobülinlere hemoglobin bağlanması veya hemopeksinlere “hem” bağlanması, bu Fe bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu stimüle edici etkisini önlemektedir^{22,35}.

12- Transferrin ve Laktoferrin: Fe iyonlarını bağlayarak serbest Fe miktarını azaltırlar³⁵.

13- Bilirübin: Albümine bağlı yağ asitlerini peroksidasyona karşı korur³⁵.

14- Ferritin: Dokulardaki Fe⁺⁺i bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engeller³⁵.

15- Mannitol: Küçük molekül ağırlıklı bu molekülün HO⁻ temizleyebileceği bildirilmiştir, fakat lipid peroksidasyonunu önleyemez^{25,35}.

16- Oksipurinol : Allopurinol metaboliti olup doğrudan HO ve HOCl radikalini azaltıcı etki gösterir³⁵.

17- Probukol: Kan kolesterolünü düşürmek için kullanılır. Aynı zamanda antioksidan etkinliği vardır³⁵.

2.3. ERİTROPOETİN (Epo)

Peritübüler hücreler ve böbrek kapillerlerinin endotel hücreleri tarafından sentezlenen eritropoetin (Epo), iki di sülfür köprüsünden oluşan 165 aminoasitten kurulu bir glikoproteindir. Epo'nun yapısındaki sialik asit ya da N-asetil-nöraminik asit ucundaki terminal molekülleri çözen bir hidroliz olayı ile aktivitesi sonlanır. Eritropoetin reseptörleri (Epo-R), eritroblastik ve megakaryositik hücreler üzerinde bulunmaktadır. Epo, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak endositozla hücre içine alınır. Epo, retikülosit sayısını ve hemoglobin sentezini artırır. Kemik iliğinde ve periferik kandaki eritrositlerin olgunlaşmasını, colony forming unit erythroidin (CFUE) proeritroblastta dönüşümü ile proeritroblastın eritrosite dönüşümündeki basamaklarda daha bariz olmak üzere çeşitli evrelerde etkiler³⁸.

Kan kaybı, anemi ve hipoksi, renal kortikal hücrelerden Epo üretimini ve kan Epo düzeyini artırır.

Doğumdan sonra ve erişkin insanda böbrekler, Epo'nun temel üretim yeri iken, fetal yaşamda ve anefrik hastalarda karaciğer Epo'nun başlıca üretim yeri olmaktadır³⁹.

Klinik kullanım için rekombirant DNA teknolojisi ile üretilen Epo'nun üç tipi vardır. Eritropoetin- α , eritropoetin- β ve eritropoetin- γ ⁴⁰.

Epo, anemi tedavisinin yanısıra ameliyat öncesi dönemde hastaların kan rezervlerini artırmak, kan transfüzyonu gereksinimini azaltmak ve ameliyat sonrası eritropoezi hızlandırması için kullanılabilir⁴¹. Ayrıca kanser, miyeloma, AIDS, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri, orak hücreli anemi ile artritlerde ve böbrek transplantasyonundan önce ve sonra görülebilen anemilerin tedavisinde de kullanılabilir. Epo'nun bağlanarak etki ettiği reseptör sitokin süper ailesinin bir üyesidir⁴¹. Epo-R'lerin bulunduğu organlar ve bu organlarda meydana getirdikleri etkiler Tablo 1.'de gösterilmiştir⁴².

Tablo 1. Epo-R yerleşim yerleri ve etkileri

HÜCRE TİPİ	Epo'nin BU HÜCREDEKİ ETKİSİ
Karaciğer stromal hücreler	Mitojenik
Endotelial hücreler	Mitojenik Ca ⁺⁺ mobilizasyonu Endotelin-1 sentez ve salınımı Anjiyogenik cevap Vasküler endotelial büyüme faktörü ile sinerjistik etkiler
Düz Kas Hücreleri	Ca ⁺⁺ mobilizasyonu Kontraksiyon
Kardiyomiyosit	Mitojenik Geliştirici Etkiler
Enterositler	Migrasyon Artmış timidin içeriği Apopitotik hücre ölümü azalması
Santral Sinir Sistemi	Ca ⁺⁺ mobilizasyonu
Nöronlar aminerjik	Artmış monoamin konsantrasyonları
kolinerjik	Artmış kolin asetil transferaz aktivitesi Trofik etkiler
Astrositler	Azalmış apopitotik hücre ölümü
Testiküler Leydig Hücreler	Artmış testosteron sekresyonu

Nöron hücrelerinde, hipoksi sırasında K, Na ve Ca⁺⁺ iyonlarına karşı membran iletkenliğinde değişikliklere rastlanır. Hipoksi esnasında oluşan bu değişiklikler, Epo'nun membran geçirgenliğini düzenleyerek intrasellüler ATP düzeyini koruyabilir⁴³.

2.3.1. RAT BEYNİNDE SPESİFİK EPO BAĞLANMA BÖLGELERİ

Epo üretiminin ana bölgesi, fetal hayatta karaciğer iken erişkinde böbreğe geçer. Böbrekte Epo üreten hücre popülasyonu, fibroblasta benzer tip1 intestinal hücreler olarak tanımlanmıştır^{41,42}. Karaciğerde Epo üretiminin kaynağı, presinüzoidal hücreler ile yağ deposu olarak bilinen non parankimal ito hücreleridir^{43,44}. Epo gen ekspresyonu oksijene bağımlı bir şekilde düzenlenir. Hipoksik durumlar, insan hepatoma hücrelerinden Hep G₂ ve Hep G₃B'den Epo üretilmesi ile sonuçlanır^{38,40}. Eritroid progenitor hücrelerdeki programlı hücre ölümünü baskılayarak eritrosit üretiminin artmasına öncülük eder⁴⁶. Epo, noneritroid hücrelerin fonksiyonel davranışlarında da etkili olabilir (Tablo 1.); Epo'nun, Epo-R reseptörüne sahip endotelial ve fetal karaciğer hücrelerinde kemotaktik ve mitojenik olması muhtemeldir⁴⁵. Epo'nun *in vivo* hasar görmüş rat nöronlarında yaşamı desteklediği ve embriyonal nöron kültüründe nörotropik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kültürde, nöronal özellikler gösteren PC12 hücrelerinde Epo-R tespit edilmiştir^{44,54}.

Böbrek gibi lokal bir organdan elde edilen Epo'nun, kan beyin bariyerini geçemediği gözlenmiş olmakla beraber, beyindeki ortamı yansıtan hücre kültüründe nöronal hücrelerin düzenlenmesinin Epo'ya bağlı olduğu ifade edilmektedir. İnsan santral sinir sisteminin tümörleri olan meningioma ve serebellar hemanjiyoblastomanın her ikisinde de sekonder eritrositozisin görülmesi ve sonuçta beyinde eritropoietin sentezinin olması bu tezi desteklemektedir⁴⁶.

Farelerde hipoksik stimülasyonun serum Epo konsantrasyonunu 40 kat artırdığı RIA ile gösterilmiştir. I¹²⁵ ile işaretlenmiş Epo'nun beyinde

gittiği alanlar tanımlanmıştır. Çok yoğun bir şekilde; kapsula interna, korpus kollosum, hipokampus fimbriyası, zona incerta, alveolus ve mamillotalamik traktusta boya tutulumu gözlenir. Orta derecede otoradyografik boyanma ise, kortikal tabakaların dışındaki neokortikal bölge ile arkeokortikal bir alan olarak bilinen hipokampusta izlenir. Hipokampusta oldukça farklı boyanma gösterildi; piramidal hücreler içeren tabakalar yoğun boya tutarken, fiber sistem içeren komşu tabakalarda boya tutulumu azdır. Ayrıca boyama ile beyin sapı, mezensefalon ve lateral posterior talamik nükleus ile normalde görülmeyen kaudatoputamen, globus pallidus ve lateral hipotalamus alanları da görülür⁴⁴.

Serebellumun otoradyografik boyanması kesit seviyesine bağlıdır. I¹²⁵-Epo bağlanması, granüler tabaka içeren kesitlerde gözlenirken diğer serebellar bölgelerde saptanamadı⁴⁴.

I¹²⁵-Epo'nun asıl bağlandığı bölge beyaz cevherdir; burası fibröz astrositler, oligodentrositler ve miyelinli sinir ağlarından oluşmuştur. Kültür hücrelerinde fonksiyonel Epo-R gözlemlenen çalışmada da söylendiği gibi, Epo-R taşıyan tek oluşum aksondur. Yapılan çalışmalarda endojen Epo-R geninde doku spesifik mRNA'nın ve transgenik fare embriyo beyinde, insan Epo-R transgenlerinin gösterilmesi ile bu çalışma desteklenmiştir⁴⁴.

2.3.2. EPO VE EPO-R'İNİN BÜYÜME VE GELİŞME ÜZERİNE ETKİLERİ

Epo ve Epo-R, fare, maymun ve insan fetus beyinde bulunmuştur. Epo yokluğu ile beyin gelişimi arasındaki ilişki hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Fare embriyosunda mutasyonla Epo ve Epo-R'nin ortadan kaldırılması ölümlü sonuçlanır. Buna rağmen SSS fonksiyonunu desteklediğine dair veriler vardır. Örneğin Epo, ratların fimbriya-forniks transseksiyonu ve asetilkolin transferaz aktivitesi ile elde edilen lezyona uğramış septal kolinerjik nöronlarda, invivo surviyi uzatırken, kültüre nöronlarda asetilkolin transferaz aktivitesini

artırmaktadır. Aynı zamanda Epo'nun nörotropik faktör gibi, nöronal gelişme, diferansiyasyon, nöronların devamlılığı ve rejenerasyonuna olumlu katkıları vardır^{42,50}.

Epo sentezi beyinde hipoksi ile artar. Beyinden elde edilen Epo dolaşımdaki Epo'ya göre daha az glikozillenmiştir, daha yüksek spesifik aktivitesi vardır ve nanomolar konsantrasyonda bile nöronal büyüme faktörü olarak fonksiyon görür. Beyinde fonksiyonel olarak bulunan Epo'nun üretim regülasyonunun, hipoksik iskemik hücre ölümünden nöronları koruyabileceğini gösterebilir⁴².

İskemik nöron hasarı bulunan hamsterlerle yapılan bir çalışmada, ön tedavi olarak uygulanan intraventriküler 2.5-5 U/gün infüzyon dozundaki rekombinant-Epo'nun(r-Epo), hipokampusta hipoksiye hassas CA-1 bölgesindeki nöronların ölümünü engellediği ve aynı zamanda, sinaptik ilişkinin korunmasında da rol aldığı gösterilmiştir⁵¹. r-Epo'nun yüksek veya düşük dozlarda böyle bir etkisinin olmaması; yüksek dozdaki Epo'nun reseptörlerde down regülasyon yapabileceğini gösterir. Endojen Epo'ya bağlanabilen çözünebilir Epo-R'nin intraventriküler infüzyonu, beyin hasarını ağırlaştırır. Epo invitro ve invivo birçok farklı nöron tipinde nöroprotektif olabilir^{42,51}. Eritropoezisi durdurmak amacıyla yapılan spesifik gen hasarından sonra, eritropoezin durmasıyla beyin gelişimi de durmaktadır⁵¹.

2.3.3. İNSAN ÇALIŞMALARI

Epo'nun mRNA'sının insan fetusunda bölgesel türlerinin ilk görülmeye başlaması gebeliğin 23-37. haftalarında olur, bu polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak gösterilmiştir. Diensefalon ve metensefalonda telensefalondan daha fazla olduğu gösterilmiştir^{42,44}.

Gelişen insan SSS'de Epo ve Epo-R'nün temporal ve hücresel dağılımı fetal ve postnatal beyinlerde PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Epo ve Epo-R proteini ve mRNA'sı gestasyonun en erken 5. haftasında tespit edilmiş ve gelişim boyunca da bulunmuştur. Post konsepsiyon 5-6. haftada embriyonik serebral hemisferde hem Epo ve

hemde Epo-R ventriküler zonda andiferansiye nöroepitelyal hücrelerde lokalizedir. Epo immunreaktivitesi insan fetal beyinde bir çok hücre tipinde bulunmaktadır (astrosit, nöronların subpopülasyonlarında ve koroid pleksus). Nöronlarda ve astrositlerde reseptör ve ligandın bulunması Epo'nin hem parakrin hemde otokrin fonksiyonu olduğunu gösterir⁵².

Gelişim boyunca koroid pleksus Epo ve Epo-R için orta derecede reaktiftir, çünkü burası BOS üretiminin yapıldığı primer yerdir. Bu nedenle Epo'nin BOS'ta bulunma olasılığını araştırmak amacıyla 23 tanesi Epo ile tedavi edilen 24-40.haftalık 50 yeni doğandan BOS örneği alınmıştır. Ayrıca Epo tedavisi almayan yaşları 1 ay ile 60 ay arasında olan hastalardan BOS alınmıştır. Bu gruplar karşılaştırıldığında preterm doğanların BOS'larında term doğanlara göre daha fazla Epo tespit edilmiştir. BOS'taki bu Epo düzeyi gestasyonel yaşın artmasıyla azalmaktadır (genç ve erişkinlerde daha az bulunmuştur). Yeni doğanlardan Epo~tedavisi alanların BOS larındaki Epo düzeyi tedavi almayanlarla aynıdır⁵².

2.3.4. EPO'NUN NONERİTROPOETİK ETKİLERİ

Epo-R'nin kendisinin intrinsek kinaz aktivitesi yoktur. Bununla birlikte, eritropoetin bağlandıktan sonra dimerize olur ve bu kompleks, Janus Kinaz-2 (JAK-2) olarak bilinen sitoplazmik protein kinazı aktive eder. JAK-2'nin aktivasyonunu takiben hücresel proteinlerde bulunan tirozin fosforile olur. Guanozin trifosfaz aktive edici protein, sinyal dönüştürücü proteinler, transkripsiyon aktivatörleri, JAK-2 aktivasyonu ile tirozinlerin fosforillenmesi sonucu aktive olan proteinlere örnektir. Bu fosforillenmiş moleküller diğer hücresel olayları etkileyip, çeşitli kaskatları indükleyerek eritropoezi stimüle ederler. Epo, hematopoetik hücreleri spesifik ve sensitif olarak doğrudan etkiler⁴².

Bununla birlikte Epo-R erişkin ve fetusta noneritroid hücre tiplerinin geniş bir çeşidinde gösterilmiştir. Fonksiyonel Epo-R, karaciğer stroma hücreleri, düz kas hücreleri, kardiyomyositler, enterositler, plasental

dokular, leydig hücreleri ve santral sinir sisteminin spesifik hücreleri gibi bir çok noneritroid hücre tipinde tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda, nonhematopoetik hücrelerdeki etkileri, hematopoetik hücrelerdeki etkilerine benzer bulunmuştur⁴². Örneğin; Epo-R'nin mitojenik etkisi, invivo olarak sadece eritroid öncül hücrelerde gözlenirken, invitro olarak bir çok hücrede bulunmuştur. Noneritropoetik ve eritropoetik hücrelerdeki etki mekanizmaları benzer olmasına rağmen, noneritropoetik hücrelerde Epo bağlanması ile başlayan Epo-R etkisinin sonuçları oldukça farklı olabilmektedir⁴². Örneğin; endotel hücrelerinin Epo-R ile inkübasyonu, eritrosit prokürsörlerinde olduğu gibi JAK 2'nin fosforilasyonunu stimüle eder. Fakat endotel hücrelerinde endotelin-1 sentez salınımını artırır ve potent anjiyogenik cevapla sonuçlanır. Epo-R ile stimüle edilmiş nöronal hücrelerin hücre tiplerine bağlı olarak, ya intrasellüler Ca^{++} artışı ile monoamin konsantrasyonunda artış olur ya da asetilkolin aktivasyonunda artış ile sonuçlanır⁴².

Epo-R'nin, kas tonusu ve fonksiyonlarının iyileşmesi gibi daha genel etkileri de olabilir. Diğer bir çok hormon ve sitokinlerle ilişkisi vardır. Ancak, insülin like growth faktör ve vasküler endotel faktör ile aralarında bulunan sinerjistik ilişkide olduğu gibi etkileri açık değildir⁴².

Epo'nun bir diğer fonksiyonunda, erken gelişme çağında nörogenezisi indüklediğidir⁴².

Yasuda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada⁴⁷ Epo'nun erken gelişme çağında nörogenezisi indüklediği gösterilmiştir. Epo-R, kalp, böbrek, göz, akciğer, ince barsak, dalak, adrenal bezler, karaciğer gibi bir çok organların doku spesifik hücrelerinde tanımlanmıştır. Kardiyogenezis ve vasküler ağın spesifik defektlerinin, embriyogenez esnasındaki Epo ile Epo-R'nin yokluğu ya da fonksiyon bozukluğuyla birlikte olduğu bildirilmiştir. İnsan amnion sıvısında Epo varlığı, plasentada Epo sentezinin olduğunu gösterir. Epo, gestasyonun erken dönemlerinde de vardır ve Epo-R içeren fetal organların gelişmesi ve büyümesi aşamalarında diğer somatik büyüme faktörleri ile etkileşmektedir⁴².

Kan-beyin ve kan-testis bariyerinden dolayı beyin ve testis dokuları normalde dolaşımdaki hormonlara maruz kalmazlar. Hipoksiye maruz kalmış beyinde Epo üretiminin gösterilmesi bu dokularda da dokuya spesifik Epo üretiminin varlığına ait bir delildir^{42,46}.

Koshimura ve arkadaşları⁴³, Epo-R'nin; Ca^{++} Emilimi ile intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonu, membran potansiyeli, hücre yaşamı, dopamin sentez ve salınımı, PC12 hücrelerinin farklılaşması ile nitrik oksit (NO) üretimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; Epo'nun, PC12 hücrelerinde doza bağlı olarak Ca^{++} Emilimi ve intrasellüler Ca^{++} konsantrasyonunu artırdığını saptadılar. Bu artış nikardipin veya anti Epo antikoları ile inhibe edildiğini, Epo'nun, PC12 hücrelerinde membran depolarizasyonuna neden olduğu ve hücre kültüründe PC12 hücrelerinin Epo ile inkübe edilmesinin proteinkinaz aktivitesini uyararak hücre bölünmesini artırdığını bildirmektedir⁴³.

Yüksek K^+ uyarısı, membran depolarizasyonuna yol açar. Bu da voltaj kapılı Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile ekzositoz, enzim aktivasyonu veya protein fosforilasyonu gibi farklı sonuçlara neden olur. Hücrelere Ca^{++} Emilimi, Epo tarafından doza bağımlı olarak artırılmaktadır. Epo'nun neden olduğu artış, nikardipin veya anti-Epo antikoları tarafından inhibe edilir. Ca^{++} kanallarının aktivasyonunun, hücre yaşamını artırdığı bildirilmiştir. Epo, Ca^{++} kanallarını aktive ederek PC12 hücrelerinde yaşamı uzatır. Nöron Growth Faktör (NGF) ve serum konulmayan hücre kültüründeki hücrelerde, somatik atrofi, nöral dejenerasyon ve hücre ölümü görülürken, yüksek K^+ uyarısı sonrası Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile nöronların yaşam sürelerinin uzadığı bildirilmiştir⁴³.

Ortama yüksek KCL verilmesiyle, hücrelerde NGF ve serum yokluğuna bağlı oluşan hücre ölümünün önlendiği, benzer etkinin, hücre kültürüne eritropoietin ilave edilmesiyle de elde edildiği rapor edilmiştir⁴³.

Aynı çalışmada Epo'nun PC12 hücrelerinden dopamin salınımına etkileri incelenmiş ve Epo verilmesini izleyen 10 dakika içinde, doza bağlı bir şekilde dopamin salınımının uyarıldığı saptanmıştır. Epo'nun

neden olduğu dopamin salınımı, nikardipin ve antiEpo antikorları ile inhibe edilir. Çünkü Ca^{++} daki bir artış, fosforilasyon veya enzim indüksiyonu ile tirozin hidrosilaz aktivitesini stimüle eder. Yine Epo'nun, PC12 hücrelerinde tirozin hidrosilaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde, DOPA dekarboksilaz inhibitörü olan NSD1015 varlığında, hücreler Epo ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilince DOPA birikiminin olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde Epo ile sağlanan DOPA artışı nikardipin ile inhibe edilmiştir⁴³.

Nitrik Oksit Sentaz (NOS), Ca^{++} daki artışla aktive olur. NO hızla stabil bileşikler olan NO_2 ve NO_3 'e dönüşür. Hücreler Epo ile inkübe edildiklerinde, NO_2 konsantrasyonu doza bağılı olarak orta derecede artar. Epo'nun neden olduğu NO_2 konsantrasyonunda ki artış da nikardipinle inhibe edilir. NOS'un maksimal aktivitesi Epo ile değiştirilemez⁴³.

Epo, Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile dopamin salınımı ve tirozin hidrosilaz aktivitesini uyarır. Erken fazda sadece dopamin salınımını stimüle ederken, geç fazda, hem dopamin hem de tirozin hidrosilazı stimüle eder. Teorik olarak Epo'nun tirozinaz aktivasyonuna neden olması, Ca^{++} bağımlı protein kinaz ya da enzim indüksiyonu yolu ile olur⁴³.

Epo, Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile NO üretimini artırır, fakat bu etki NOS'un maksimal aktivitesinde görülmez. Epo NOS aktivitesini, NOS moleküllerinin sentezini artırarak değil, NOS molekülünde allosterik değişiklikler yaparak gerçekleştirir. Çünkü NO, dopamin, GABA ve asetil kolin gibi nörotransmitterlerin salınımını artırır, hatta Epo'nun neden olduğu dopamin salınımının bir kısmı NO üretimi ile mümkün olabilmektedir⁴³.

2.3.5. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE EPO VE EPO-R

Epo-R, nöronal hücre serilerinden bir kısmıyla (PC12, SK-N-MC ve NT2 hücreleri) insan ve fare SSS elde edilen astrosit ve nöron içeren hücre kültüründe gösterilmiştir⁵⁴. Bu hücrelerdeki reseptörlerin fonksiyonel olduğu uyarıldığında hücreye spesifik yanıtlar

alınmasındandır⁴². Fakat nöronal reseptörler daha az duyarlıdır. PC12 hücrelerinde aktive edilmiş Epo-R mRNA'sı, rat eritroid öncül hücrelerince aktive edilen Epo-R mRNA'sı ile benzerdir⁴².

Özel durumlarda Epo'nun nöronları koruyucu özelliği aşağıdaki deneysel verilerle desteklenmektedir⁴²;

1-Kültüre edilmiş nöron ve nöron prekürsörü olan hücrelerin hipoksiye maruz kalmaları halinde meydana gelebilecek hasar, supra fizyolojik konsantrasyonda (5 U/ml) rekombinant eritropoetinin (r-Epo) ortama eklenmesiyle önlenabilir⁴⁸.

2-Serebral, kortikal ve hipokampal nöron kültürlerinin Epo'nun fizyolojik konsantrasyonları (3 pmol) ile 8 saatten uzun bir süre tedavi amaçlı maruz bırakılması, NMDA aracılı glutamatla indüklenmiş nöron ölümünü önleyebilir⁴⁸.

3-İnsan nöron prekürsör hücre serilerinden NT2 hücrelerinin Epo'nun fizyolojik konsantrasyonları (50 mU/ml) ile tedavi amaçlı maruz bırakılması, ultraviyole radyasyonun indüklediği apoptozu azaltabilir⁴⁸.

2.3.6. EPO'NUN ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİ

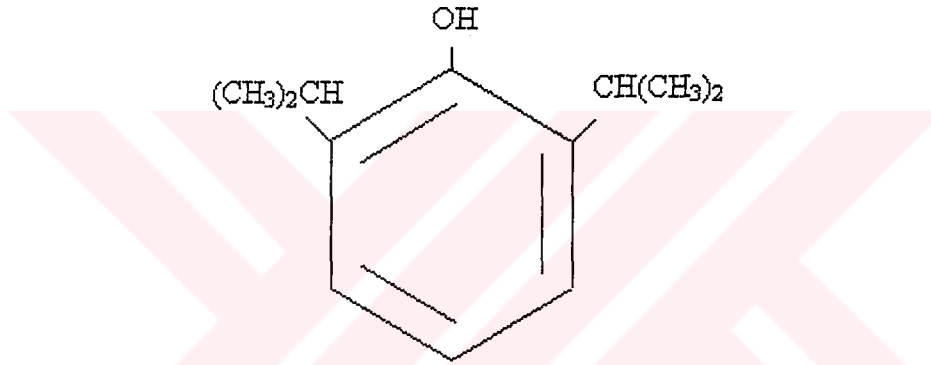
Epo'nun nöronlardaki fonksiyonlarının mekanizması henüz çok açık değildir. Ama bazı yazarlar, Epo'nun; Ca^{++} akımı, NO üretimi ve apoptoz genlerinin düzenlenmesi sayesinde nöroprotektif etkilerinin olabileceğini düşünmektedir⁴⁸.

H_2O_2 'in ortama verilmesini takiben hipoksi ile indüklenmiş Epo üretimi inhibe olur, bunu takiben Epo mRNA seviyeleri düşer. H_2O_2 , HIF 1α protein akümüülasyonunu bloke ettiği bulunmuştur. HIF 1α , HIF deneni dimerik transkripsiyon faktör kompleksinin bir subünitidir. Ayrıca H_2O_2 , Hep G₂ hücrelerinde Epo geni ekspresyonunun negatif modülatörü olan GATA-2'nin miktarını artırır. Hücrelerin H_2O_2 ile Epo üretiminin inhibisyonu, desferoksamin ve 2,2-dipiridil gibi demir şelatörleri ile inkübasyonu ile engellenebilir. Ortamda bulunan demir iyonları, H_2O_2 'ten açığa çıkan hidroksil radikalleri fenton reaksiyonu ile transkripsiyon faktörlerinin stabilitesini direkt veya indirekt etkileyebilir.

Bunu redoks sensitiv kinaz aktivitesini etkileyerek yapar. Bu çalışmaya göre Epo üretimi üzerine H_2O_2 'in etkisi gerçekte TMTU yada dihidrorhodamin ile önlenabilir ki bunlar hidroksil radikallerini ortadan kaldırma görevi vardır. Kroll ve arkadaşlarına ise H_2O_2 'de elde edilen hidroksil radikalleri PO_2 bağımlı tirozin hidroksilaz gen ekspresyonunda rol oynadığını rapor etmiştir⁵³.

2.4. PROPOFOL

Propofol kimyasal olarak bir 2,6 diizopropil fenol'dür (Şekil 1)^{55,56,57}.



Şekil 1. Propofolün yapısal formülü

Fenol deriveleri üzerinde 1970 öncesi yapılan çalışmalar, propofolün senteziyle sonuçlanmıştır⁵⁷. Propofolün potansiyel bir indüksiyon ajanı olduğunu doğrulayan ilk klinik sonuçlar, 1977 yılında Kay ve Rolly tarafından bildirilmiştir⁵⁸. Başlangıçta kullanılan Cremophor EL içindeki solüsyon, şiddetli enjeksiyon ağrısına ve anafilaktoid reaksiyonlara sebep olduğu için klinik kullanımdan çekilmiş ve 1982'de % 10 soya yağı içinde % 1'lik emülsiyonu hazırlanmıştır^{55,58}.

2.4.1. FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

Propofol, hipnotik özellikleri olan alkilofenol grubundandır. Alkilofenoller oda ısısında yağdırlar ve sıvı solüsyonlarda erimezler. Sunulan % 1'lik propofol formülasyonu, % 10 soya yağı, % 2,25 gliserol ve % 1,2 yumurta fosfatidi içerir.^{56,58} pH'sı 7,0 olan bu solüsyon hafif vizköz ve süt beyazı rengindedir. Oda ısısında stabildir ve ışığa duyarlı değildir.⁵⁷ Şimdiki formülasyonlarında % 0,005 disodyum edetat veya % 0,025 sodyum metabisülfid vardır. Bu mikroorganizmaların büyüme hızlarını azaltmaya yardımcı olur⁵⁶.

2.4.2. FARMAKOKİNETİK ÖZELLİKLERİ

Propofolün farmakokinetiği birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Kan seviyesi, 2,5 mg.kg⁻¹ dozdaki propofolün bolus enjeksiyonunu takiben redistribüsyon ve eliminasyon sonucu hızla düşer. Propofolün birincil distribüsyon yarı ömrü 2-3 dakikadır⁵⁸. Terminal yarılanma ömrü 3.6-63.0 saat, klirensi 870-2140 ml.dk⁻¹ ve dağılım volümü 180-1730 litredir⁵⁸. Belirlenen bu klirens, karaciğer kan akımından yüksektir. Bu nedenle ekstrahepatik metabolizmanın varlığı ileri sürülmektedir^{60,61}. Yüksek klirensi ve kan konsantrasyonunun hızla düşüşü, propofölü tek başına, N₂O veya opiyoidler ile birlikte kullanıldığında ideal bir anestezi ajan haline getirmektedir⁵⁸.

Propofolün farmakokinetiği; yaş, genetik yapı, ağırlık, yandaş hastalıklar, birlikte kullanılan ilaçlar gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Kadınlar daha büyük dağılım volümü ve klirens hızına sahiptir, fakat eliminasyon yarı ömrü, kadın ve erkeklerde benzerdir. Yaşlılarda klirens ve santral kompartman volümü azalmıştır. Çocuklarda ise santral kompartman volümü yüksek, klirens hızlıdır. Karaciğer hastalıklarında aktif kısım ve santral kompartman volümü artmaktadır⁵⁷.

Propofolün yüksek yağ çözünürlüğü etki başlangıcının tiyopental kadar hızlı olması ile sonuçlanır (bir kol-beyin dolaşım zamanı). Tek bir bolus dozundan sonra uyanma çok hızlıdır (2-8 dakika). Çoğu araştırmacı

propofolden derlenmenin çok hızlı olduğunu; tiyopental, metoheksital ve etomidattan daha az artık etki oluşturduğunu söyler. Yaşlı hastalarda dağılım volümü düşük olduğu için daha düşük indüksiyon dozu tavsiye edilir⁵⁶.

Propofol glukuronid ve sülfatlarla konjüge olarak metabolize olur. Metabolitleri propofol glukuronid, 1 ve 4-guinol glukoronidler ve 4-guinol sülfattır. Ekstrahepatik metabolizma karaciğer transplantasyonu geçirecek hastaların anhepatik fazında doğrulanmaktadır. Akciğerler bu anhepatik metabolizmanın yeri olarak görünmektedir^{57,60}. Böbrekten, % 1'den azı değişmemiş metabolitler halinde atılır. Yalnızca % 2'si feçesle atılır⁵⁷.

2.4.3. KARDİOVASKÜLER ETKİLERİ

Propofolün kardiyovasküler sistem üzerine en belirgin etkisi sistemik vasküler rezistansı, kardiyak kontraktileti ve preloadu düşürerek arteriyal kan basıncını azaltmasıdır. Hipotansiyon, tiyopental ile olandan daha güçlüdür, fakat laringoskopi ve entübasyon gibi stimülasyonlarla geri döndürülebilir. Hipotansiyonu kötüleştiren faktörler yüksek dozlar, hızlı enjeksiyon ve yaşlılıktır⁵⁶. Kardiyovasküler hastalığı bulunmayanlarda, 2.0-2.5 mg.kg⁻¹ propofol indüksiyonu, sistolik kan basıncında % 25-40 düşüş oluşturur⁵⁷. Benzer düşüş ortalama ve diastolik kan basıncında da gözlenir. Propofolün vazodilatör etkisi, sempatik aktiviteyi baskılaması ve düz kas kalsiyum mobilizasyonuna doğrudan etkisi nedeniyle ortaya çıkar⁵⁷. Propofol hipotansiyona normal arteriyal baroreflaks cevabı bozar; bu nedenle indüksiyonu takiben kalp hızı anlamlı derecede değişmez. Nadiren, vagal aracılı refleks bradikardi yoluyla preloadda göze çarpan bir düşüş olur⁶⁷. Kalp hızındaki ve kardiyak debideki değişiklikler kardiyak problemi olmayan hastalarda genellikle geçici ve anlamsızdır. Fakat yeterince şiddetli olursa, özellikle yaşlı hastalarda, negatif kronotropik ilaç alan hastalarda ve okülokardiyak refleksle ilişkili cerrahi prosedürlerde

asistoliye yol açabilir⁵⁶. Çocuklarda propofolle anestezi indüksiyonunu takiben, kalp hızında ve ortalama arter basıncında % 10-20 düşüş bildirilmektedir⁶¹.

Anestezi idamesi sırasında, 100 µg.kg⁻¹.dk⁻¹ propofol infüzyonu, arteriel kan basıncında % 30 düşüş oluşturur. Preload % 12 azalır. Kardiyak output etkilenmez. Atım volümü ve kalp hızı değişmez⁶⁷. Miyokardial kan akımında ve oksijen tüketiminde azalma oluşur ki sonuçta, miyokardial oksijen arz-talep oranı korunur⁵⁶.

2.4.4. SOLUNUM SİSTEMİNE ETKİLERİ

Propofolün solunum depresan etkisi barbitürlara benzer. Sıklıkla indüksiyon dozunu takiben geçici apne görülür^{55,56}. Propofol bilinçli sedasyon amacıyla subanestezik dozlarda kullanıldığında bile hipoksiye solunumsal yanıtı ve hiperkarbiye normal cevabı baskılar⁵⁶. Apne süresi ve insidansı doza, enjeksiyon hızına ve premedikasyona bağlı olarak değişir. Propofolün 2.5 mg.kg⁻¹ indüksiyon dozunu takiben solunum sayısı iki dakika süre ile azalır. Tidal volüm ise dört dakika süresince azalmış olarak devam eder. Propofol'ün 100 µg.kg⁻¹.dk⁻¹ idamesi, tidal volümde % 40 düşüş ve solunum sayısında % 20 artış ile sonuçlanır. İnfüzyon hızını iki kat artırmak, tidal volümdeki düşüşü artırırken, solunum sayısını daha fazla artırmaz. Karbondioksit artışına solunumsal yanıt, propofol idamesi süresince azalır. Hipoksiye solunumsal yanıtı 50-120 µg.kg⁻¹.dk⁻¹ propofol infüzyonu baskılar. Kronik obstrüktif hastalığı olanlarda, propofolle bronkodilatasyon gelişir. Ancak bu etki, halotandaki kadar belirgin değildir⁵⁷. Propofol histamin salınımına neden olsa bile, barbitürlat ve etomidatla karşılaştırıldığında astımlı olan ve olmayan hastalarda weezing insidansı daha düşüktür ve astımlı hastalarda kontrendike değildir⁵⁶. Propofol üst hava yolu reflekslerini tiyopentalden daha etkili bir şekilde baskılar. Bu da laringeal maske yerleştirilmesi ve kas gevşetici kullanılmaksızın yapılan trakeal entübasyonu kolaylaştırır^{55,56,61}.

2.4.5. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNE ETKİLERİ

Propofol hipnotik bir ajandır⁶². Kesin etki mekanizması hala bilinmemektedir. Öne sürülen etki mekanizması, GABA ile uyarılan klor kanallarının fonksiyonlarının değiştirilmesi şeklindedir⁵⁶. GABA reseptörüne bağlandığı yer barbitürat ve benzodiazepinlerden farklıdır. Propofolün nikotik asetilkolin reseptörlerinin kanal açılma zamanını azalttığı gösterilmiştir¹. Hipnoz, 2.5 mg.kg⁻¹ dozu takiben hızla başlar. Hipnoz süresi doza bağlıdır ve 5-10 dakika sürer. Subhipnotik dozlarda propofol sedasyon ve amnezi oluşturur. Stimülasyon uygulanmayan gönüllülerde 2 mg.kg⁻¹.sa⁻¹ propofol infüzyonu, bu amaç için yeterlidir. Daha yüksek infüzyon hızlarına rağmen operasyon sırasında farkında olma bildirilmektedir. Halüsinasyon, seksüel fantaziler ve opustotonus propofol anesteziinden sonra bildirilmektedir⁵⁷.

Propofol serebral kan akımını azaltır ve kafa içi basıncı artmış veya normal olan hastalarda kafa içi basıncını düşürür^{56,60,62,63}. Propofol serebral oksijen tüketimini (CMRO₂) düşürür ki bu, beynin iskemik hasarını önlemek için yararlıdır⁶³. Fokal iskemi sırasında serebral korumanın derecesi muhtemelen propofol ve tiyopental ile benzerdir⁵⁶.

Propofol EEG'de doza bağlı değişiklikler yapar. Propofol sedasyon amacıyla düşük hızda verildiği zaman EEG'de beta aktivitesini artırır, bilinç kaybı oluşturduğu zaman delta aktivitesi artar, daha yüksek infüzyon hızlarında EEG'de burst supresyona neden olur⁶¹. Propofolün antikonvülzan özellikleri baskındır, status epileptikus tedavisinde başarıyla kullanılır ve epileptik hastalar için güvenilirdir⁶². Bazı çalışmalarda 2 mg.kg⁻¹ propofolün bolus infüzyonunu takiben temporal lob epilepsisi görüldüğü ileri sürülürken, bazı çalışmalarda propofolün konvülsiyonları tetiklemediği, ancak antikonvülzan aktivite de göstermediği belirtilmektedir^{61,62}.

Propofolün subhipnotik dozlarda bir özelliği de antiprütik etkisidir. Bunun subkortikal orijinli olduğu öne sürülmektedir⁵⁵.

Propofolle indüksiyona, subkortikal glisin antagonizmasından kaynaklandığı tahmin edilen, kas seyirmesi, spontan hareketler, opustotonus veya hıçkırık gibi eksitatuvar reaksiyonlar eşlik edebilir. Bu reaksiyonlar tonik-klonik nöbetlerle karışabilir. Propofol anestezi indüksiyonu ve idamesi süresince göz içi basıncını anlamlı derecede düşürür^{56,57,64}.

Propofolün sözlü uyarıya yanıtı engelleyen kan konsantrasyonu 3.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, cilt insizyonuna hareketle cevabı engelleyen kan konsantrasyonu 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'dir. Fentanil ilavesi ile bu konsantrasyonlar anlamlı derecede düşer. Benzodiazepin veya % 66 nitroz oksit ile birlikte kullanıldığında, cilt insizyonuna hareketle cevabı önleyen konsantrasyon 2.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'dir. Propofolün % 66 nitroz oksit ile küçük cerrahi girişimlerde gerekli kan konsantrasyonu 1,5-4,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, majör cerrahi girişimlerde 2.5-6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'dir Farkında olma 1.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'nin altında, oryantasyon ise 1.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'nin altında oluşur⁵⁷.

2.4.6. DİĞER ETKİLER

Propofolün yeni formülasyonları nondepolarizan ve depolarizan kas gevşeticilerle oluşturulan nöromüsküler blokajı potansiyalize etmez^{56,57}.

Propofol malign hipertermiyi tetiklememektedir. Bu nedenle malign hipertermi riski olan hastalarda, tercih edilecek ajandır. Porfirialı hastalarda da güvenle kullanılır⁶⁵.

Propofolün emülsiyonundaki koruyucu maddelere karşı anaflaktoid reaksiyonlar ve doğrudan propofole karşı bazı hastalarda immün yanıt geliştiği bildirilmektedir⁶⁶. Propofole karşı anaflaktoid yanıt geliştiren hastaların çoğunluğunda allerji öyküsü mevcuttur. İlaç allerjisi olanlarda propofol dikkatle kullanılmalıdır^{57,66}.

Propofol anlamlı derecede antiemetik etkiye sahiptir. Propofolün antiemetik etkisinin süresi, etkili dozu ve etki mekanizması hala bilinmemektedir⁵⁵.

Propofolün uzun süreli infüzyonlarından sonra bile tolerans gelişmemiştir⁵⁶.

Propofol enjeksiyonundan sonra hastaların % 28-90'ında ağrı görülür. Sedasyon amacıyla düşük dozlarda verilse bile % 33-50 oranlarında ağrı görülür. Propofole bağlı venöz ağrının mekanizması bilinmemekte olup, kinin kaskadının aktivasyonunun sorumlu olduğu sanılmaktadır⁶¹.

2.4.7. PROPOFOLÜN ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİ

Propofolün antioksidan etkisi; bilinen antioksidanlar olan butilhidroksitoluen ve α -tokoferol (Vit-E) ile kimyasal yapı benzerliğinden kaynaklanmaktadır⁷¹. Propofol sadece lipid peroksidasyonunu önlemekle kalmaz, aynı zamanda bir antioksidan olan glutasyonun aktivitesini de artırır. Propofolün glutasyon ile ilgili enzimler üzerine olan etkileri, bu ilacın antioksidan etkinliğini artırır. Propofol; glutasyon redüktaz (GSHrd) ve glutasyon transferaz (GSHtf) aktivitesini arttırarak okside glutatyondan (GSH) redükte glutatyon (GSH) dönüşümü indükler. GSHrd ve GSHtf aktivasyonunu diğer proteinlerdeki sülfidril grupları aracılığı ile yapmaktadır⁶⁸.

De la Cruz ve ark⁶⁸; propofolün, tiobarbitürik asit reaktif ürünlerinin üretimini %25,7 oranında azaltırken glutasyon içeriğini %24.6 artırdığını ve glutasyonun okside formu normalde %29.5 iken, propofol ile anestetize edilmiş olgularda daha düşük bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca propofol ile glutasyon peroksidaz aktivitesinde %28.3, glutasyon transferaz aktivitesinde %41 oranında azalma olurken, glutasyon redüktazda belirgin bir değişikliğin olmadığı ve sonuç olarak propofolün insanlarda antioksidan özelliğinin olduğu bildirilmektedir⁶⁸.

Propofolün antioksidan etkisinin varlığı, trombosit membranında lipid peroksidaz üretimini azaltması ve glutasyon antioksidan sisteminde değişiklik yapmasıyla kanıtlanmıştır. Propofolün hayvan dokularındaki lipid peroksit üretimini azaltıcı etkisinin derecesi; özellikle karaciğer ve serebral mikrozomlar, araşidonik asit ve linoleik asitten zengin kimyasal

ortam, Vit E eksikliği olan rat karaciğer dokusu, iskemi-reperfüzyon uygulanmış rat beyin dokusu gibi deney ortamlarındaki farklılıklara bağlı olduğu bildirilmiştir⁶⁸.

Propofol ve diğer lipofilik antioksidanlar, intrasellüler pH'nın (pHi) regülasyonu ile beyin korunmasına katkıda bulunmaktadır⁶⁹.

Astrositlerdeki pH'nın regülasyonunda; Na/H exchanger isoform-1 (NHE₁), Na/K ko-transporter ve Cl/HCO₃ exchangerler predominant ko-transporterlerdir. Sitozolda biriken protonlar, NHE₁'in duyarlı bölgesi ile birleşerek plazma membranında Na-proton yer değişimini artırır. NHE₁'den yoksun farelerde ataksi ve epilepsi olduğu gözlemlendiğinden, NHE₁'in beyin fonksiyonları için önemli olduğu sonucuna varılmıştır. NHE₁ aktivitesi, 5-N-ethyl-N-isopropyl amilorid (EIPA) gibi amilorid analogları ile selektif olarak bloke edilir. EIPA, bikarbonatsız ortamda bulunan astrositlerin, intrasellüler asidik yüklerinden kurtulmasını engellerken, fizyolojik bikarbonat konsantrasyonlarında bu etkisini gösterememektedir⁶⁹.

Propofolün, NHE₁ aktivitesini ve astrositlerdeki oksidan stres sırasında pHi duyarlı glutamat emilimini koruduğunu göstermeyi amaçlayan bir çalışmada, propofol ve tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) maruz bırakılmış rat astrosit hücre kültüründe; pHi, intrasellüler glutatyon (GSH) konsantrasyonu ve glutamat uptake hızı ölçülerek pHi'yi manüple etmek için ortama NHE₁ ve bikarbonat ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şunlardır: Glutamat uptake sisteminin çalışmaması ekstrasellüler ortamda glutamat birikimine ve nöronların eksitotoksik ölümüne neden olur. Ortamdan glutamatın temizlenmesi, astrositler aracılığı ile olmaktadır. Astrositlerdeki oksidatif stres, ATP'yi tüketip Na-K ATPaz'ı inhibe ederek intrasellüler Na-proton seviyesini yükseltmektedir. Propofolün, oksidasyonu inhibe etmesiyle, glutamatın astrositlere emilimini ve sinaptik aralıklardan temizlenmesini artırdığı böylece ekstrasellüler ortamda toksik düzeyde glutamat birikimini engelleyerek nöronların eksitotoksik ölümünü önlediği gösterildi.

Astrositler, sinaptik aralığa salınmış glutamatin küçük parçalara ayrılmasında önemli rol oynar⁶⁹.

Aynı sonuçlar, E vitamininin, t-BOOH tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu baskılayarak gösterdiği antioksidan etki ile de görülür⁶⁶. Propofol, fenolik OH gruba sahip olmasıyla α -tokoferole benzerlik gösterir. Vit-E, lipofilik radikalleri süpüren ve membrandaki lipid peroksidasyonunu inhibe eden bir ajandır. Propofol t-BOOH'ya maruz kalmış hücrelerde, NHE₁ aktivitesini çeşitli mekanizmalarla korumaktadır⁶⁹;

1- Lipid peroksidasyonu inhibisyonu

2- t-BOOH nedeniyle oluşan ATP tüketiminin engellenmesi (Astrositik NHE₁ aktivitesi intrasellüler ATP'ye bağlıdır)

3- Na kanallarını bloke etmesi ve Na/K ATPaz aktivitesini devam ettirmesi ile NHE₁ inhibisyonuna neden olabilecek sitozolik Na konsantrasyonu artışının engellenmesi

4- NHE₁'in regülatuar bölgelerini modüle ederek oluşan Na/H exchange aktivasyonu.

Propofolün HOCl, süperoksit, hidrojen peroksit ve OH radikallerini direkt süpürücü etkisi olduğunu gösteren, insan plazması, rat karaciğer mitokondrisi, mikrozomları ve beyin sinaptozomları üzerinde yapılmış çalışmada⁷⁰; propofolün malon dialdehit (MDA) üretimi üzerine etkisi çalışılmış ve antiperoksidatif etkisinin, butilat hidroksi toluenle karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir. Propofol, aynı zamanda hidrojen peroksit veya hidroksil, ferril ve oxo-ferril radikalleri ile başlatılan lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Propofol, invitro ortamda zincir kırıcı olarak etki eder ve daha stabil olan propofol fenoksil radikallerinden H çıkarması işlemi ile oluşan lipid peroksit radikallerini süpürür⁷⁰.

Klinikte kullanılan konsantrasyonlarda propofol; nötrofil polarizasyonunu, fagositozu ve insan PMN lökositlerinde bakteri öldürme işlemi baskılar. PMN lökositlerinde bakteri öldürme işlemi, respiratuar burst (oksidatif öldürme) şeklinde olduğu için antioksidan

maddeler bu işlemi baskılayabilir. Propofolün respiratuar burst üstündeki etkisinin bir kısmı, içerdiği lipid komponente bağlı olabilir. Anestezik konsantrasyonlarda propofol, nötrofil polarizasyonunda %50 inhibisyon yaparken, daha yüksek konsantrasyonlarda tam inhibisyon yapar⁷⁰.

Nöronlar ve astrositlerde yüksek affiniteli glutamat transporterleri (Nöronlardaki EEAT2/EAAC ve EAAT4 ile astrositlerde EEAT1/GLAST ve EEAT2/GLT-1), plazma membranında lokalizedir. Ekstraselüler glutamat konsantrasyonu; travma, inme ve oksidatif stresle karakterize diğer durumlarda da artar. Burada serbest radikallerin aşırı üretimi denmesinin amacı, üretim hızının, eliminasyon hızından fazla olmasıdır. Glutamat transporterleri redoks ajanlara duyarlıdır. Örneğin okside hidrojen peroksit, astrosit hücre kültürlerinde glutamat uptake'ni engellerken bu işlem thiol-spesifik redüktan dithiothreitol tarafından geri çevrilir. Propofolün faydalı etkileri eksitotoksik reseptörlere direkt etkisiyle değildir. Çünkü propofol, nöronal glutamat NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşan, nöronal hasarı daha çok artırır. Reaktif oksijen ürünleri, glutamatın nöronal ve astrositik uptakeinden sorumlu, yüksek affiniteli Na bağımlı glutamat transporterlerinin yapı ve fonksiyonunu etkiler⁷¹.

İzole organeller kullanılarak yapılan çalışmalarda propofolün, rat karaciğer, mitokondri, mikrozom ve beyin sinaptozomlarında oksidatif strese bağlı indüklenebilen lipid peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir⁷¹.

İnsanlarda yapılan başka bir çalışmada: İzofluran verilen grubunda kas ve plazma MDA konsantrasyonlarında anlamlı bir artış varken, propofol grubunda sadece plazma konsantrasyonlarında hafif bir artış gözlenmiştir⁷².

Propofolün, anestezik konsantrasyonlardaki uzamış uygulamaları, yüksek affiniteli glutamat uptake'ini önlemiş, D-aspartat salınımını ile laktat dehidrogenaz salınımını stimüle etmiştir. Bunu t-BOOH sayesinde yapmıştır. Propofol oksidatif stresten sonra orta derecede

strese maruz kalmış astrositlerde volum sensitif organik anyon kanalları (VSOAC) aktivasyonunu inhibe ederek ve bir çok ciddi hasar görmüş hücrede, membran lizisini önleyerek eksitatuvar amino asitlerin salınımını azaltır. Serebral korumada hem propofolun hem de hipotermimin oksidatif metabolizmayı baskılayarak katkıda bulunduğu bildirilmektedir⁷⁴.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. RATLARIN TEMİNİ VE DENEYLERE HAZIRLANMASI

T.C. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Enstitüsünden temin edilen Wistar albino dişi ratlar özel kafeslerde, havalandırması olan, 20-22 °C sıcaklığında loş bir odada tutuldu, standart rat pellet yem ve çeşme suyu verildi. 200-250 g arası ratlar rasgele alınarak cerrahi işlem sırasında gruplandırıldı.

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

1. grup: Sham grubu (Sham) (n=4); Bu grupta eter anestezisi altında batın açılarak vena cava inferior'dan 5 ml kan alınarak ratlar sakrifiye edildi. Kafa servikal vertebradan kesilerek ayrıldı. Foramen magnumdan her iki temporal bölgeye doğru skalp kesildi. Aynı hattan kemikler kesilerek kaldırıldı, beyin dokusu serbestleştirildi.

2. grup: Kontrol grubu (n=6); Hayvanlar eter anestezisi altında uyutulduktan sonra sagittal sütür hattına uyan median 1cm'lik bir kesi ile skalp kaldırıldı. Parietal kemikleri üzerine, 60 cm yükseklikten 60 g ağırlığındaki cisim bir tüp içinden düşürülerek kapalı kafa travması oluşturuldu⁸. Ratlar 24 saat sonra sakrifiye edilerek beyin dokuları çıkarıldı.

3. grup: Propofol grubu (n=6); Kafa travması yapıldıktan 10 dakika sonra⁴¹ intra peritoneal (i.p) propofol (100 mg/kg) verildi. 24 saat sonra ratlar yukarıda anlatıldığı gibi sakrifiye edilerek dokuları çıkarıldı.

4. grup: Eritropoietin (Epo) grubu (n=6); Ratlarda kafa travması oluşturulduktan 10 dakika sonra i.p. eritropoietin (5000 U/kg) verildi⁴¹. 24 saat sonra ratlar yukarıda anlatıldığı gibi sakrifiye edilerek dokuları çıkarıldı.

5. grup: Propofol+Eritropoietin grubu; Kafa travması oluşturulduktan 10 dakika sonra propofol (100mg/kg) ile eritropoietin (5000U/kg) birlikte i.p. verildi.

Çıkarılan beyin lobları hemen soğuk izotonik su ile yıkandı ve alüminyum folioya sarılıp -85°C derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı. Alınan kanlar 1500xg'de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve ependorf tüplerine aktarıldı. Derin dondurucuda -85°C de saklandı.

3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLERDE KULLANILAN ALET VE KİMYASALLAR

Çalışmada şu aletler kullanılmıştır: Santrifüj cihazı (Rotina 48 RC Germany), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601 Japan), homojenizatör (Ultra Turrax T25 basic Germany) , hassas terazi (Mettler PM 100 İsviçre), derin dondurucu (Nuaire -85°C Ultralow Freezer Japan), pH metre (Mettler Toledo MP 220 İngiltere).

Çalışmada kullanılan maddeler şunlardır: Kloroform, etil alkol, EDTA (Na tuzu), Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, %30 H₂O₂ , NaN₃, KH₂PO₄, 4-aminoantipyrine, fenol kristali, hexadecyltrimethyl ammonium bromid, HCl, n-butanol, kadmiyum granülleri, NaOH, CuSO₄, H₂SO₄, NaNO₂, Na₂B₄O₇, ZnSO₄, KNO₃, triklor asetik asit (TCA), Na₃Sitrat, %85 fosforik asit, lityum sülfat ve brom (MERCK), ksantin, Nitroblue tetrazolium (NBT), bovine serum albumin (BSA), ksantin oksidaz (XO), glutatyon-redükte formu (GSH), NADPH-redükte formu, glycine (amino asetic acid), sulphonil amide (p-aminobenzen

sulphonamide), N-(1-Naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride, sodyum tungstat, di-sodium molybdic acid ve CuCl₂ (SIGMA) kullanılmış olup analizler Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.4. NUMUNELERİN KORUNMASI, HOMOJENİZASYONU VE DENEY İÇİN HAZIRLANMASI

Numunelerin Korunması:

Derin dondurucudan çıkarılan dokuların buzlu çözöldükten sonra buzla soğutulmuş distile su ile yıkandı. Bu işlem 3 defa tekrarlandı.

Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler:

PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu; 0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCl solüsyonu 50/39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı. Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı.

Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması:

Yaş ağırlıkları 1 g olarak ayarlanan beyin dokuları soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla küçük parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan NO ve MDA tayinleri yapıldı.

Homojenatlar 3220 rpm/30 dakika + 6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan CAT⁷⁵, XO ve protein⁸¹ tayinleri yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortexlenip cam tüpte 3220 rpm/40 dakika devir soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.5. BEYİN DOKUSUNDA BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.5.1. SOD ENZİMİNİN (TOTAL SOD) AKTİVİTE TAYİNİ

SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna⁷⁶ ve Durak ve arkadaşlarının⁷⁷ tariflediği modifikasyona göre tayin edildi. Bu metotta SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Kullanılan Reaktifler

0.3 mmol/L xanthine, 0.6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), 150 µmol/L NBT, 400 mmol/L Na₂CO₃, 1g/L bovine serum albumin (BSA), xanthine oxidase (XO), 2M (NH₄)₂SO₄ , 0.8 mmol/L CuCl₂

3.5.2. CAT enziminin aktivite tayini

Metodun prensibi: Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı⁷⁵. Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂ katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kullanılan reaktifler:

Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM), absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu (H₂O₂ çözeltisi).

3.5.3. XO ENZİMİNİN AKTİVİTE TAYİNİ

Analizin Prensi: XO (EC 1.1.3.22) aktivitesi Prajda ve arkadaşlarının⁷⁸ metoduna göre çalışıldı. Bu metotta XO aktivitesi; numunede bulunduğu farzedilen XO'ın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, %100'lük TCA solüsyonunun eklenmesi ile sabitlenir. Spektrofotometrede 293 nm dalga boyunda absorbands değeri ölçülür. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir ve aktivite IU/mg protein cinsinden ifade edilir.

Kullanılan Reaktifler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5): 0,5mM Na₂EDTA'lı, 4mM ksantin, TCA (%100, w/v).

Analizin Yapılışı:

0,5mM Na₂EDTA ve ksantin, numunelerle 37°C'de 30 dakikalık inkübasyona bırakıldı. TCA (%100) ilave edildi ve 3500xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant alınarak önce kör sonra numune olmak üzere 293 nm dalga boyunda okunur. XO aktivitesinin hesabında standart olarak ürik asit kullanıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.4. MDA MİKTARININ TAYİNİ

Doku MDA düzeyi Esterbauer ve arkadaşlarının⁷⁹ metoduna göre çalışıldı. Bu metodun prensibi, MDA'nın 90°-100 °C'de tiyobarbiturik asit ile reaksiyona girebilme esasına dayanmaktadır. Bu TBA test reaksiyonunda MDA veya MDA benzeri moleküller TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorbands veren bir pembe pigment oluşturur. Reaksiyon pH 2-3 ve 90 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilir.

Kullanılan Reaktifler:

29 mmol/L tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (pH'sı 2.8), 6 M HCl ve n-Butanol kullanıldı.

Analizin Yapılışı: Örnekler önce mevcut proteinleri çöktürmek için kendinden iki kat fazla hacimde olan soğuk 10%'luk (w/v) trikloroasetik asid ile muamele edilir. Presipitat santrifüjleme ile dibe çöktürülür. Süpernatandan bir miktar alınarak eşit miktardaki % 0.67'lik (w/v) TBA ile kaynayan su içerisinde 10 dakika reaksiyona sokulur. Soğuttuktan sonra absorbands 532nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede okunur. MDA miktarının hesaplamaları ise standard olarak 1,1,3,3 tetramethoxypropane'ın seri dilusyonları ile elde edilen standart grafiğinden yapıldı. Elde edilen sonuçlar gram beyin doku ağırlığı başına mikromol olarak ifade edildi.

3.5.5. NO MİKTARININ TAYİNİ

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir. Çünkü NO, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrata (NO_3^-) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için homojenatları önce deproteinize edip daha sonra total nitrit konsantrasyonlarını ölçüldü. Zor olmakla birlikte *in vivo* olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların *in vitro* *ex vivo* şartlarda çalışılması mümkün değildir.

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlendi. Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlendi.

Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlendi⁸⁰.

Kullanılan Reaktifler:

Kadmiyum granülleri (Cd), pH 9.7 Glisin-NaOH tamponu, sülfanilamid, N-Naphthylethylene diamine (NNDA), 5 mmol/L CuSO₄, 0.1 mol/L H₂SO₄, standart solüsyonu (0.1 mol/L NaNO₂, 10 mmol/L Na₂B₄O₇), 75 mmol/L ZnSO₄, 55 mmol/L NaOH

Kadmiyumların Aktifleştirilmesi:

Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtılır. Granüller deiyonize su ile yıkanır. 1-2 dakika CuSO₄ solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon dökülür. Granüller glisin tamponu ile yıkanarak deneyde kullanılır.

Analizin Çalışılması:

Deproteinizasyon işlemi: 500 µL numune + 2mL ZnSO₄ vortekslenir. 1.250 mL NaOH ilâve edilip tekrar vortekslenir ve 3500xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant numune olarak kullanılır.

En son glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir. 1 mL deproteinize numune konur. Üzerine 2 mL deiyonize su ilâve edilir. 90 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 2 ml alınıp üzerine 2.5 mL deiyonize su, 1 mL sülfanilamid, 1 mL NNDA ilâve edilip 1 saat inkübe edilir. 545 nm'de köre karşı okunur.

Nitrit Standartlarının hazırlanması:

Stok solüsyon: 0.1 mol/L NaNO₂ hazırlanır. Hazırlanan standart solüsyonundan elde edilen "Optik Dansite (OD) – µmol/L" grafiği ile numune sonuçları hesaplandı.

3.5.5.EKSTRAKSİYONLU VE EKSTRAKSİYONSUZ NUMUNELERDE PROTEİN TAYİNİ

Analizin Prensibi (Lowry Metodu): Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada

rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10 da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir⁸¹.

Kullanılan reaktifler:

CuSO₄, Na₃Sitrat, Na₂CO₃, NaOH, Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi

Analizin yapılışı: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonunu bildiğimiz Bovin serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. "Optik dansite (OD) – mg/mL protein konsantrasyonu" grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu.

3.6- İstatistiksel Analizler

İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS[®] 9.0 ile yapıldı. Grupların dağılımları non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Gruplar normal dağılım gösterdiğinden, grupların karşılaştırılmasında parametrik testlerden; one-way ANOVA testi ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. Gruplar içi korrelasyon analizi için Pearson Korelasyon testi kullanıldı. Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu deneysel çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1-5'te özet olarak verilmiştir.

Tablo 1. Beyin travması yapıldıktan 24 saat sonra beyin dokuları çıkarılan ratların gruplara göre ölçülen oksidan/antioksidan parametrelerinin ortalamaları ve bunlara ait istatistiksel anlamlılık testleri.

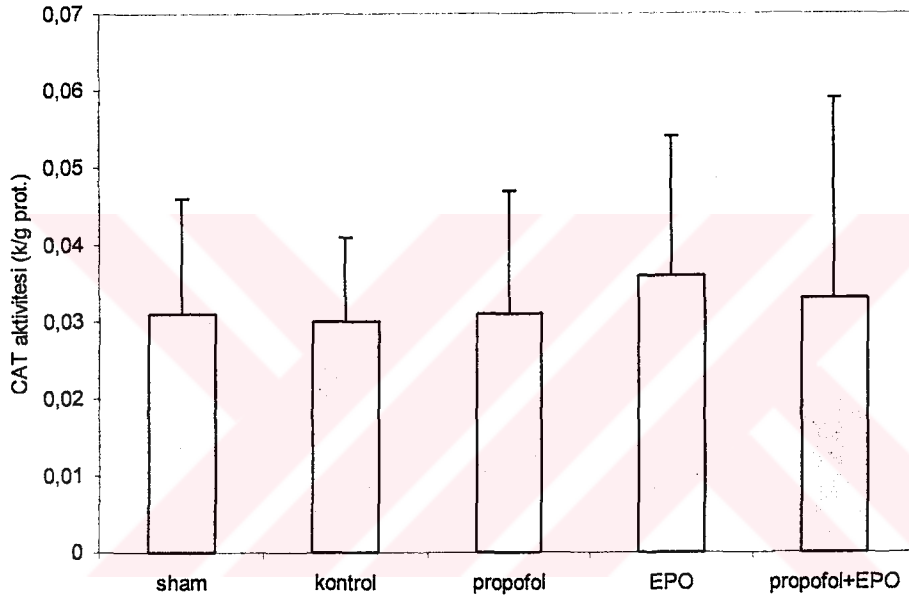
Gruplar	CAT (k/g prot)	SOD (U/g prot)	XO (U/g prot)	MDA(nmol/ g yaş doku)	NO (μ mol/gyaşdoku)
1-Sham	0.031 \pm 0.015	28.3 \pm 2.4	0.054 \pm 0.037	10.78 \pm 1.07	0.192 \pm 0.048
2-Kontrol	0.030 \pm 0.011	27.8 \pm 6.4	0.139 \pm 0.047	17.38 \pm 3.70	0.296 \pm 0.034
3-Propofol	0.031 \pm 0.016	28.5 \pm 6.1	0.129 \pm 0.069	7.28 \pm 1.00	0.178 \pm 0.060
4-Epo	0.036 \pm 0.018	30.5 \pm 7.5	0.068 \pm 0.040	6.88 \pm 1.22	0.190 \pm 0.083
5-Propofol+ Epo	0.033 \pm 0.026	42.1 \pm 31.0	0.079 \pm 0.052	6.82 \pm 1.19	0.171 \pm 0.060

P değerleri

1-2	a.d.	a.d.	0.018	0.0001	0.014
1-3	a.d.	a.d.	0.034	0.014	a.d.
1-4	a.d.	a.d.	a.d.	0.007	a.d.
1-5	a.d.	a.d.	a.d.	0.006	a.d.
2-3	a.d.	a.d.	a.d.	0.0001	0.003
2-4	a.d.	a.d.	0.026	0.0001	0.006
2-5	a.d.	a.d.	a.d.	0.0001	0.002
3-4	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.
3-5	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.
4-5	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.

CAT: katalaz, SOD: süperoksit dismutaz, XO: ksantin oksidaz, MDA: malondialdehit, NO: nitrik oksit, Epo: eritropoietin

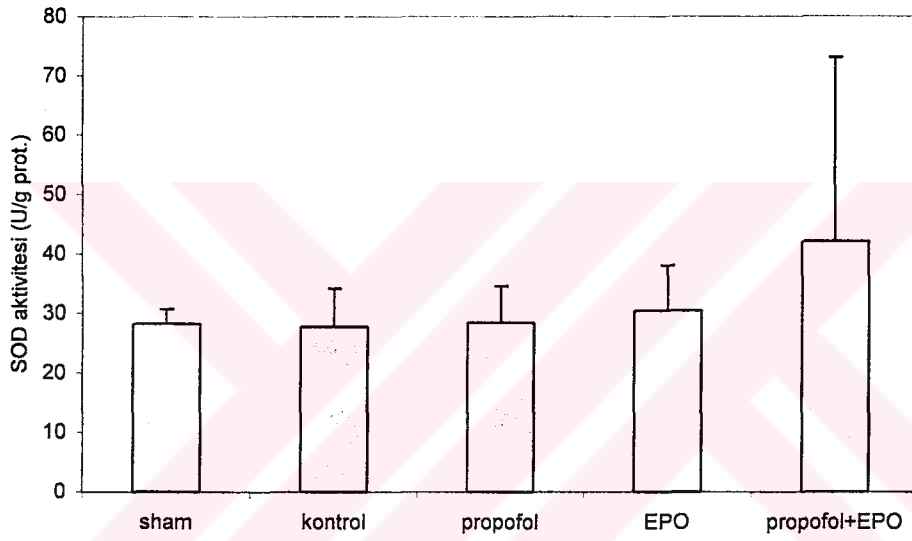
4.1. DOKU CAT AKTİVİTESİ



Şekil 1. Beyin dokusunda tespit edilen katalaz (CAT) aktivitelerinin gruplara göre dağılımı. Sütunlar ve hata çizgileri sırası ile ortalama ve standard deviasyonu göstermektedir. Epo: eritropoietin

Sham grubundaki CAT aktivitesi değerleri genel olarak diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında insan ve rat beyin dokularında tespit edilen değerlere yakındı. CAT aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

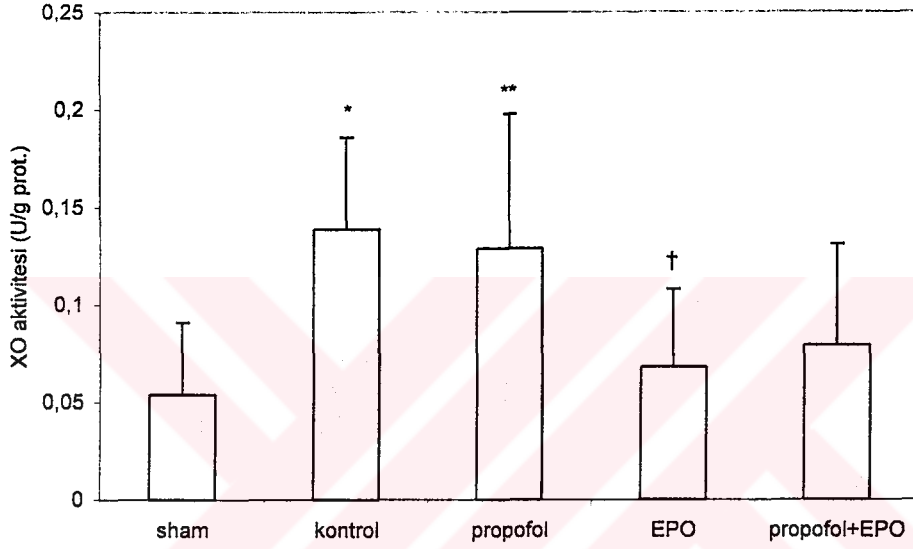
4.2. DOKU SOD AKTİVİTESİ



Şekil 2 . Beyin dokusunda tespit edilen süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin gruplara göre dağılımı. Sütunlar ve hata çizgileri sırası ile ortalama ve standard deviasyonu göstermektedir. Epo: eritropoietin

Sham grubunda saptanan SOD aktivite değerleri daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında insan ve rat beyin dokularında tespit edilen değerlere yakın olduğu görüldü. Sham, kontrol, propofol ve Epo gruplarında ölçülen SOD aktivite düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Epo+Propofol grubunda, SOD aktivitesi düzeyi diğer gruplara göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanamadı.

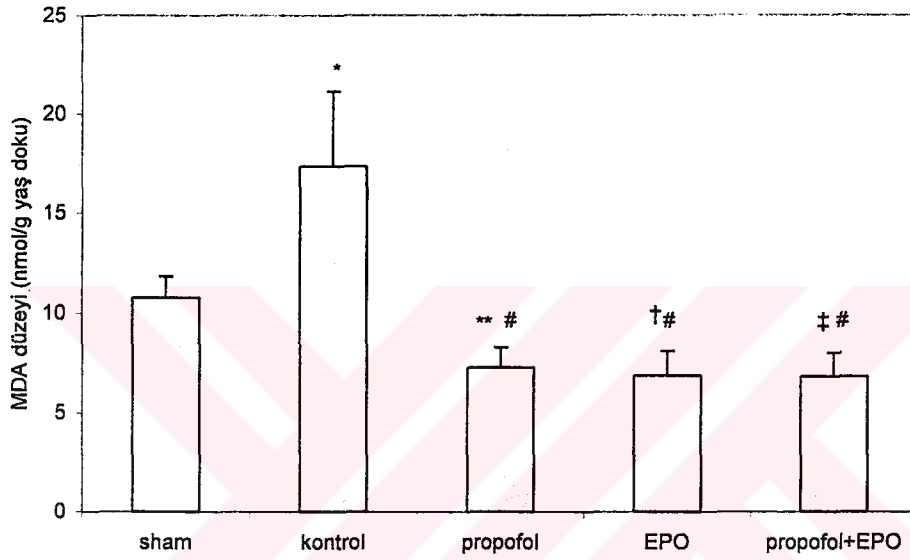
4.3. DOKU XO AKTİVİTESİ



Şekil 3. Beyin dokusunda tespit edilen ksantin oksidaz (XO) aktivitelerinin gruplara göre dağılımı. Sütunlar ve hata çizgileri sırası ile ortalama ve standard deviasyonu göstermektedir. * $p=0.018$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, ** $p=0.034$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, † $p=0.026$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Kontrol grubunda XO aktivitesi, sham grubuna göre yaklaşık olarak %250'lik bir artış gösterdi. Propofol grubunda ise XO aktivitesi sham grubuna göre yaklaşık %200'lük bir artış vardı. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlıydı. Epo ve Epo+propofol grubundaki XO aktivitesinde, sham grubuna göre anlamlı bir fark yoktu. Epo grubunda, kontrol grubuna göre XO aktivitesi anlamlı düzeyde düşüktü. Epo ve Epo+propofol grubundaki XO aktivitesi kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

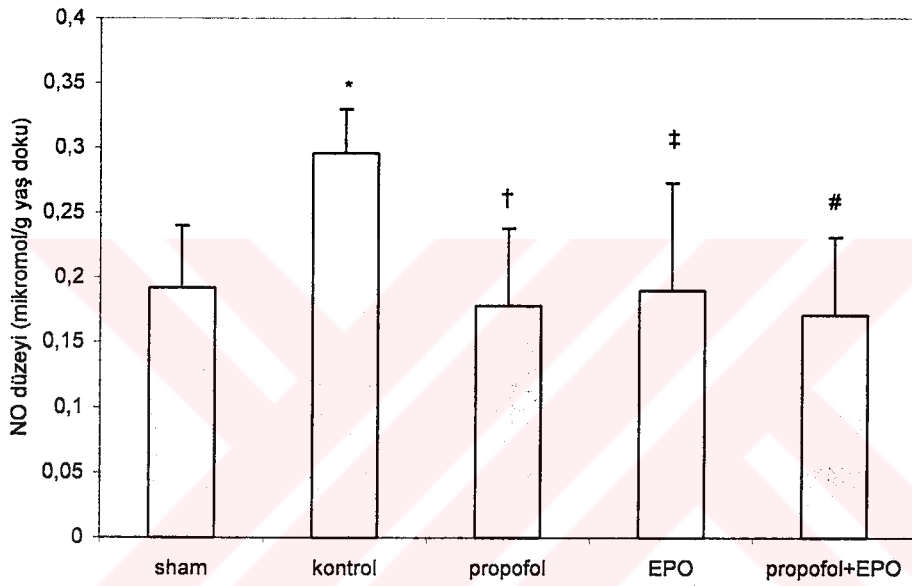
4.4. DOKU MDA DÜZEYİ



Şekil 4. Beyin dokusunda tespit edilen malondialdehit (MDA) düzeylerinin gruplara göre dağılımı. Sütunlar ve hata çizgileri sırası ile ortalama ve standard deviasyonu göstermektedir. * $p=0.0001$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, ** $p=0.014$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, † $p=0.007$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, ‡ $p=0.006$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, # $p=0.0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. Epo: eritropoietin.

Kontrol grubunda MDA düzeyi sham grubuna göre oldukça yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0001$). Propofol, Epo ve propofol+Epo gruplarının MDA düzeyi sham grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.014$, 0.007 , 0.006). Propofol, Epo ve propofol+Epo gruplarındaki MDA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça düşük düzeydeydi ($p<0.0001$, 0.0001 , 0.0001).

4.5. DOKU NO DÜZEYİ



Şekil 5. Beyin dokusunda tespit edilen nitrik oksit (NO) düzeylerinin gruplara göre dağılımı. Sütunlar ve hata çizgileri sırası ile ortalama ve standard deviasyonu göstermektedir. * $p < 0.014$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, † $p = 0.003$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ‡ $p = 0.006$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, # $p = 0.002$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. Epo: eritropoietin

Kontrol grubundaki NO düzeyi, sham grubuna göre oldukça yüksek bulundu (% 50) ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.014$). Propofol, Epo ve propofol+Epo gruplarının NO düzeyi ile sham grubu arasında farklı bulunmadı. Propofol, Epo ve propofol+Epo gruplarındaki NO düzeyi kontrol grubu göre yaklaşık %80 daha az olarak bulundu. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.003, 0.006, 0.002$).

5. TARTIŞMA

Beyin dokusu birçok özelliği nedeni ile ROS hasarına daha çok yatkın bir organdır. Bunlar kısaca aşağıda sıralanmıřtır⁹⁴.

- 1) Beyin dokusunu oluşturan hücrelerin membranları lipid bakımından diğer organların hücrelerinden daha zengindir.
- 2) Nöronların membran/sitoplazma oranları diğer hücelere göre daha büyüktür, yani oran membran yönüne doğru kaymıştır.
- 3) Oksidatif metabolik aktivite oldukça yüksektir.
- 4) Oksidan strese koruyucu enzimler olan antioksidan enzimler, özellikle de CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri düşüktür.
- 5) Spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla endojen olarak fazla miktarda ROS üretilmektedir. Bunun en iyi örneği dopamin oksidasyonudur.
- 6) Periferel hasara yatkın olan uzamış akson morfolojisi ile uyumlu nöronlara özgü özelliklerinin varlığı.
- 7) Nöronların son bölünmesini tamamlamış olması ve dolayısıyla bölünememesi hasara uğrayan hücrenin yerine yenisinin gelememesi sonucunu doğurmaktadır, bu da dokunun hasara daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır. Beyin dokusu bütün bu özellikleri dolayısıyla oksidatif strese diğer doku ve organlardan daha yatkındır. Bu yüzden korunma ihtiyacı diğer dokulardan daha fazladır. Bunların dışında ayrıca beyinin diğer organ ve dokulara göre fazladan serbest

radikal üretiminin arttırıldığı bazı metabolik yollara sahip olduğu görülmektedir. Bu yollar özetle dopamin, adrenalin ve noradrenalin gibi yıkıldığında serbest radikal üretimine sebep olan hormonlardır⁸⁹. Ayrıca bunların ara ürünleri de aynı şekilde otooksidasyona uğrayarak ROS üretimini arttırabilmektedir. Özellikle iskemi, hipoksi ve travma gibi oksijenlenmenin azaldığı veya tamamen ortadan kalktığı durumlarda özellikle reperfüzyondan sonra dışarıdan antioksidanların takviye edilmesine ihtiyaç vardır⁹⁴.

Bu deneysel araştırmada kafa travması oluşturulan ratlara, travmanın oluşturacağı birincil ve ikincil patolojileri engellemek amacı ile gruplara propofol ve Epo verildi ^{54,55,69,70,71,72,73,74}, bir gruba ise her iki ajan birlikte verildi. Beyin dokusunda antioksidan enzimlerden CAT ve SOD aktiviteleri, oksidan bir enzim olan XO aktivitesi, membran lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi ve ayrıca aynı zamanda bir serbest radikal olduğu kabul edilen NO düzeyi ölçüldü. CAT ve SOD enzim aktivitelerinin sadece, travma oluşturulan grupta ve travma ile birlikte yukarıda adı geçen ajanların uygulandığı gruplarda hiçbir değişikliğe uğramadığı tespit edildi. Beyin dokularında CAT aktivitesinin SOD aktivitesine göre bir hayli düşük olduğu tespit edildi (yaklaşık 1000 kat). Beyin dokusunda antioksidan enzimlerin aktivitelerinin diğer organ ve dokulara göre daha az olduğu bilinen bir gerçektir⁷⁹. XO aktivitesi, travma oluşturulduktan sonra yaklaşık 2.5 kat arttı, propofol verilmesi aktivitede herhangi bir değişikliğe neden olmadı. Ancak Epo'in tek başına verilmesi aktiviteyi sham grubunun değerine kadar geriletmese de önemli ölçüde azalttı. Epo'nun propofol ile birlikte verilmesi XO aktivitesini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede azaltmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu deneysel çalışmada elde edilen en çarpıcı bulgular MDA düzeyi ile ilgili bulgulardır. Kontrol grubunda kafa travması oluşturulması beyin dokusunda lipid peroksidasyonunun artması ile sonuçlandı. Propofol, Epo ve ikisinin birlikte verildiği durumlarda kafa travması sonucu oluşan lipid peroksidasyonu önemli derecede azaldı.

Her bir uygulamada MDA düzeyi sham grubunda saptanan düzeyden daha da düşük idi. Propofol ve Epo'in birlikte ve ayrı ayrı verildiği durumlarda beyin dokusunu travmaya karşı koruduğunun açık bir delili olarak lipid peroksidasyonunu önleyici etki yapmıştır. MDA düzeyindeki değişimlere benzer değişimlerin NO düzeyinde de olduğu saptandı. Travma, beyin dokusunda muhtemelen NO sentezleyen yolların aktivitesinin artması ile NO düzeyini arttırdı, travma ile eşzamanlı olarak ayrı ayrı veya birlikte verilen propofol ile Epo, NO artışını kontrol altında tutarak sham grubunda saptanan değerlere yakın değerlerin gözlenmesine neden oldu. Sonuçlara toplu olarak bakıldığında; verilen ajanların, antioksidan enzimler (SOD, CAT) üzerine herhangi bir etkisinin gözlenmemesi göz ardı edilecek olursa, travmanın doku hasarı oluştururken kullandığı muhtemel biyokimyasal ve fizyolojik yolların tedavi etme ve koruma amacı ile ratlara verilen ajanların etkisi ile baskı altına alındığı söylenebilir. Bu bulgulardan hareketle her iki ajanın kafa travmasının başlangıç aşamalarında birlikte veya ayrı ayrı verilmesinin ikincil hasara karşı koruyucu olduğu söylenebilir.

Epo'nun normalde KBB'ni geçemeyecek büyüklükte olmasına rağmen KBB'nin bütünlüğünü bozan durumlarda sistemik dolaşıma verilen Epo KBB'ni geçebilir⁴¹. Epo'nun nöron koruyucu etkisinin görülebilmesi için travmadan 24 saat önce veya travmadan sonraki ilk 3 saat içinde verilmesi gerektiği bildirilmektedir⁴¹. Bu nedenle çalışmamızda Epo i.p. olarak travmadan 10 dk sonra verildi.

Propofolun (2,6-diizopropilfenol) yapısı incelendiğinde E vitamininin yapısına çok benzediği görülmektedir⁸⁴. Moleküler yapısında bulunan hidrokarbon zincirler bu bileşiğin tıpkı E vitamini gibi membranları kolayca geçebilmesini veya burada lokalize olarak oksidatif strese karşı bir duvar oluşturmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla E vitaminine benzer olarak taşıdığı gruplar antioksidan özelliklerinin de aynı zamanda temelini oluşturmaktadır⁸⁵.

Kafa travmasından kısa süre sonra oluşmaya başlayan ve hızla ilerleyen beyin ödemi, birçok patolojik sürecin başlamasına neden olmaktadır, bunlardan en önemlilerinden biri de hiç şüphesiz damarsal yapıların baskı ile daralarak hipooksijenasyona ve ayrıca anoksiye neden olmasıdır. Beyin travmaya maruz kaldığında, serebral otonöregülasyon bozulur ve küçük serebral arterler genişler, kapiller hidrostatik basınç artar, kan plazması intersellüler alana geçerek beyinde dolaşım bozukluğu meydana getirir¹. Dolayısıyla travma sonrasında ardı sıra meydana gelen olaylar kısmen iskemi tablosuna benzemektedir⁸⁸. Beyinde bu tür hasarlarının önüne geçmek için birçok ajan denenmiştir, bunların en önemlilerinden biri E vitamindir^{80,82,87}. E vitamini yapısında bulundurduğu hidroksil grubu nedeniyle elektron alıp verme özelliği kazandığından dolayı antioksidan karakterli bir vitamin olarak bilinmektedir. Ayrıca yapısında bulunan uzun hidrokarbon zinciri ve halkasal yapılar nedeni ile daha çok lipidlere benzediğinden bütün lipid yapılarını, yani membranları kolayca geçebilmekte veya membranların yapısı içine lokalize olarak oksidatif strese oldukça yatkın olan lipid yapılarını membranların oksidatif stres sonucu olarak gelişebilecek lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Geçiş elementlerinin veya redoks potansiyeline sahip elementlerin varlığında özellikle hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu olarak bilinen bir reaksiyonla daha potent bir ROS olan hidroksil radikali (OH⁻) üretilmektedir. Bu radikalın yarı ömrü çok kısa olmakla birlikte bulunduğu ortamdaki kimyasal bileşiklerle veya yapılarla kolayca reaksiyona girerek hasar oluşturabilecek kapasitededir⁹¹. Bu hidroksil radikalleri özellikle membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olmakta, membranın üç boyutlu yapısını değiştirmekte, membran içinde lokalize olan ve transporter, reseptör veya yapısal fonksiyon gören proteinlerin fonksiyonlarını etkilemekte, membranın geçirgenliğini değiştirmekte ve seçici geçirgen özelliğini yok etmektedir. Ayrıca kalsiyumun sitoplazmik konsantrasyonunun aşırı artması sonucu, bu iyonun ikinci haberci

fonksiyonu görmesinden dolayı birçok metabolik süreci tetiklemekte, hücreler kontrolü kaybettiğinden dolayı apoptozis veya nekroz meydana gelmektedir⁹². Bunların dışında ortamda bulunan anormal miktardaki süperoksit radikali (O_2^-), yine nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından sentez edilen NO ile birleşerek peroksinitrit ($ONOO^-$) üretme eğilimindedir⁹³. Peroksinitrit ise çok kuvvetli bir oksidan ajandır. Hücre içinde veya hücreler arası sıvıda oluştuğunda biyomoleküllere etki ederek onların yapısını bozmakta ve zarar vermektedir. Aminoasitler, proteinler, lipidler, DNA ve RNA dahil olmak üzere diğer ROS türleri gibi bütün biyolojik yapılara zarar vermektedir. Görüldüğü gibi ROS türlerinin birbirleri ile reaksiyonlarında oluşan ikincil ürünler de oksidatif stresin zararlı etkilerine katkıda bulunmaktadır.

Anestezik bir ajan olan propofol aynı zamanda yoğun bakım ünitelerinde sedatif olarak da kullanılmaktadır. Bu ajan yaklaşık olarak son on yıl antioksidan özellikleri nedeni ile de ayrıca ilgi odağı olmuştur^{95,96}. Bu etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde gösterilmiştir^{97,98}.

Eritropoietin (Epo) iki di sülfür köprüsünden oluşan ve 165 aminoasitten kurulu bir glikoproteindir. Asıl görevi eritroid seri hücrelerinde üretimi ve farklılaşmayı sağlamaktır. Bununla birlikte eritropoietin reseptörlerinin eritroid hücre serilerinin dışındaki hücrelerde (karaciğer stroma hücreleri, nöronlar, testiküler leydig hücreleri gibi) bulunması Epo'nun eritropoezis dışında fonksiyonları olabileceğini düşündürmüştür. Wu ve arkadaşlarının⁴⁹ yaptıkları deneysel çalışmada, fare embriyosunda Epo'suz şartlarda kardiyogenezisin ve damarsal ağın gelişmesinde spesifik defekt olduğu gösterilmiştir. Yasuda ve ark tarafından Epo'nun fetusta SSS'nin gelişmesinde önemli rolü olduğunu gösteren çalışmalarında embriyoda Epo'suz şartlarda nörogenezisin durduğu gösterilmiştir⁴⁷.

H₂O₂ canlı dokular için zararlı bir üründür. Bu metabolit GSH px tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir. Epo GSH px'in üretimini uyarır. Çalışmamızda tespit edilen bazı bulgular oldukça öneme sahiptir. Normalde çekirdekli hücrelerde pürin bazlarının yıkımında son aşamalarda etkili olan XO enzimi büyük bir oranda ksantin dehidrogenaz halinde bulunmaktadır⁹⁹. İskemi durumlarında enzim molekülü proteolitik bir parçalanmaya uğrayarak XO enzimine dönüşür¹⁰⁰. XO aktivitesi ile her bir substratın işlenmesi esnasında sitokiyometrik olarak süperoksit radikali üretilir. Bu radikal üretildiği ortamda fazla miktarda olduğunda lipidler başta olmak üzere bütün biyolojik yapılara zarar verebilmektedir. Bu çalışmada, sadece travma oluşturulan kontrol grubunda iskemik durumlara benzer şekilde XO aktivitesinde önemli bir artış meydana geldi. Bu artış aynı zamanda beyin dokusunda oksidatif stresin arttığına bir göstergesidir. Epo tek başına veya propofol ile kombine olarak verildiğinde XO aktivitesi sham grubuna yakın çıkmıştır. Bu; Epo'nun antioksidan özelliği ile ksantin dehidrogenaz enziminin XO haline dönüşmesini engellenmesine bağlanabilir.

Kontrol grubunda, MDA düzeyinin artması XO artışı ile paraleldir. MDA artışı da oksidatif stresin artışının bir göstergesidir. Propofol ve Epo ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında beyin dokusundaki MDA düzeylerini düşürmüştür. Diğer bir ifade ile bu iki antioksidan ajan lipid peroksidasyonunu engellemektedir. Bu bulgudan hareketle, propofol ve Epo'nun her ne kadar antioksidan enzimlere etkileri gözlenmese de direkt antioksidan etkileriyle travmaya bağlı doku hasarını engelleyebileceğini söyleyebiliriz.

Deney gruplarımızdan kontrol grubunda beyin dokusu NO düzeyinin artması hasarın ilerlemesi ve devamlılığı açısından oldukça önemlidir. Çünkü yukarıda da bahsedildiği gibi XO'nun ürünü olan süperoksit radikali ile NO birleşince oldukça oksidan ve potent bir molekül olan peroksinitrit oluşmaktadır.⁹³ Peroksinitrit membran yapılarında daha ileri bozulmalara sebep olabilir. NO artışında söz konusu olan enzim

muhtemelen beyin dokusunda en fazla bulunan NOS izoenzim nöronal NOS'tur (nNOS)². Fakat beyinin damar dokularında endotelial NOS da bulunduğundan bu izoenzimin de artıştan sorumlu olabileceği veya en azından katkısı olabileceği söylenebilir. Bazı araştırmacılar özellikle iskemik ortamlarda NO düzeyinin artmasını dokuya zarar veren bir değişiklik olmayıp tam tersine dokuyu korumaya yönelik bir değişiklik olarak tarif etmişlerdir^{101,102}. Çünkü NO artışı, diğer bir açıdan bakıldığında, süperoksit radikalinin tüketilmesi ve ortamdan uzaklaştırılması anlamını taşımaktadır. Bu yolla süperoksit radikali hidrojen peroksite, o da hidroksil radikaline dönüştürülemediğinden doku hasarının daha az olması ihtimali vardır. Her ne kadar aşırı NO üretilmesi ile oluşumu hızlanan ONOO⁻, dokulara çok zararlı bir bileşik olsa da diğer bir zararlı yolun işleyişini durdurduğundan faydalı olarak değerlendirilmiştir^{101,102}. Hangi yolun tercih edildiğinde beyin dokusunun daha çok korunacağı ise yoruma açıktır. Bizim bulgularımızın ışığında bir yorum yapmak gerekirse, beyin dokusu hasarının önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerine bakıldığında NO artışının dokuya zarar verdiği görülmektedir. Propofol ve Epo verilen gruplarda NO artışı MDA düzeylerinde olduğu gibi engellenmiştir. Burada akla en yakın olan yorum bu ajanlar antioksidan özelliklerinin dışında bir yolla NOS aktivitesini ve böylece NO düzeyini azaltmış olabilirler. Epo'nun nöronlardaki fonksiyonları henüz tam açık değildir. Ama Ca⁺⁺ akımının düzenlenmesi, NO üretiminin düzenlenmesi, apoptoz genlerinin düzenlenmesi ile nöroprotektif etki edebileceği düşünülmektedir¹⁰³. Diğer bir yorum ise NO'nun bizim deney şartlarımızda ölçmediğimiz bir metabolit haline çevrilmesi ihtimalidir. Bu ajanlar, hangi yol kullanılırsa kullanılsın sonuç olarak NO ve MDA düzeyinin azalmasına paralel olarak beyin hasarı oluşumunu azaltmıştır.

Serbest radikaller endojen ve eksojen yollarla sürekli olarak üretilmekte olup fizyolojik koşullarda bunları yok eden antioksidan sistem ile dengede olduğu için herhangi bir sorun oluşturmazlar. Membranlarda

prostaglandin sentezi, mitokondrial ve mikrozomal elektron transport sistemleri, oksidan enzimler ve diğler bazı yollar endojen olarak serbest oksijen radikallerinin üretildiğı yerlerdir. Bu üretilen serbest oksijen radikalleri veya daha genel bir sınıflama ile reaktif oksijen türleri (ROS) antioksidan özellikli proteinler, enzimler ve kimyasal bileşiklerle sıkı bir şekilde kontrol altında tutulurlar⁸⁶. Oksidatif stresin artması ve/veya antioksidan sistemin zayıflaması, ROS kaynaklı hasarların oluşması için başlangıç aşamasını oluşturmaktadır. Bu şekilde dengenin vücudun aleyhine bozulması en sıklıkla iskemi reperfüzyon hasarlarında kendini göstermektedir. Örneğın nörolojik bozukluklardan stroke, iskemi reperfüzyon hasarını anımsatan özelliklere sahip olan ve oksidatif stresin büyük rol oynadığı klinik bir patolojidir^{83,89,90}.

Klinik açıdan düşünöldüğünde, kafa travması ile getirilmiş acil vakaların ameliyatlarında seçilmesi gereken anestezi ajanının aynı zamanda oksidatif stresi azaltıcı etkisi ve travmanın ileri patolojilerini önleme kapasitesine sahip olması gerekmektedir. Propofol bu açılardan uygun bir ajan gibi görünmektedir.

Bu çalışmada farklı nöroprotektif özellikleri bilinen Epo ve propofol, ayrı ayrı ve birlikte verildi. Birlikte verilmelerinin amacı nöroprotektif kapasitelerinde sinerjistik bir etki olup olmadığının incelemektir. Çalışmanın sonunda bu ajanların birlikte verilmelerinin tek başlarına verilmesine bir üstünlüğü olmadığını gördük.



6. SONUÇ

Antioksidan özellikleri nedeni ile hasarın oluşumunu engelleme veya en azından oksidan süreci geciktirme konusunda başarılı olacağını hipotetik olarak varsaydığımız Epo ve propofolün travmanın ikincil hasarlarından koruyucu özellikleri olduğunu tesbit ettik. Beyin gibi oksidatif hasara oldukça yatkın olan bir organın travmadan sonra lipid peroksidasyonundan bu ajanların uygulanması ile korunduğunu azalan MDA düzeyleri ile gösterdik. Ayrıca oksidan bir enzim olan XO aktivitesinin ve serbest radikal olarak kabul edilen NO'nun propofol ve Epo verilen gruplarda birbirinden bağımsız olarak azalması bu ajanların etkinliğini gösteren iki ayrı parametredir. Ancak, bu ajanların antioksidan etkinlikleri konusunda daha kapsamlı *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan kafa travmasında propofol ve eritropoetinin antioksidan enzimlerden CAT ve SOD aktivitesi, oksidan bir enzim olan XO aktivitesi, membran lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyi ve NO düzeyi üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Toplam 28 adet wistar albino dişi rat kullanıldı ve deney grupları sham, kontrol, Epo (5000 U/kg), propofol (100 mg/kg) ve Epo (5000 U/kg)+propofol (100 mg/kg) olarak oluşturuldu.

SOD ve CAT düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. MDA ve NO düzeyleri Epo, propofol ve Epo+propofol gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düşüktü. XO düzeyinde ise Epo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş varken, propofol grubunda sham grubuna göre anlamlı yüksekti.

Sonuç olarak kafa travması sonrası verilen Epo ve propofol MDA, XO ve NO düzeylerini normal beyin dokusu düzeyine düşürdü. Bu nedenle, Epo ve propofolun beyin dokusu için antioksidan özellik taşıdığını düşünmekteyiz. Epo ve propofolün birlikte verilmesinin ayrı ayrı verilmelerine bir üstünlük sağlamadığı saptandı.

SUMMARY

In this study we aimed to examine the effects of propofol and erythropoietin on antioxidant enzymes (CAT, SOD) activity, oxidative enzyme (XO) activity, NO and MDA that is the last product of membrane lipid peroxidation in the rats with closed head trauma.

28 wistar albino female rats were allocated to five groups as sham, control, Epo (5000 U/kg), propofol (100 mg/kg) and given both Epo (5000 U/kg) and propofol (100 mg/kg).

There were no significant differences in SOD and CAT tissue levels in all groups. MDA and NO levels were decreased significantly in Epo (5000 U/kg), propofol (100 mg/kg) and given both Epo + propofol groups.

XO enzyme activity was significantly lower in Epo group than in control group and significantly higher in propofol group than in sham group.

As a result; after head trauma Epo and propofol decreased MDA, NO, XO levels to baseline levels. Therefore; we thought that Epo and propofol both have antioxidant properties for brain tissue. This experimental study has shown that; combination of Epo and propofol had no significant advantages against Epo or propofol alone.

8. KAYNAKLAR

- 1- Gökalp HZ, Erongun U: Kafa travmaları Nöroşiruji Ders Kitabı Ankara Mars, 1988; s. 202-234.
- 2- Özben T: Pathophysiology of cerebral ischemia. Mechanisms involved in neuronal damage. In: Free Radicals, Oxidative stress, and Antioxidants (Eds. Özben T). Plenum Press, New York, 1998, p.163-187.
- 3- Sagara Y, Hendler S, Khoh-Reiter S, Gillenwater G, Carlo D, Schubert D, Chang J: Propofol hemisuccinate protects neuronal cells from oxidative injury. J Neurochem 1999; 73: 2524-2530.
- 4- Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C: Neuroprotection and Angiogenesis. Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. News Physiol Sci 2000;15: 225-229.
- 5- Jennett B, Lindsay KW: Temel Nöroşirürji. Çeviri:Özcan OE, Turgut M, Açıkgöz B. 1994; s. 229-232.
- 6- Miller JD, Piper IR, Jones PA: Neurotrauma: Trauma Pathophysiology of Head Injury. Mc Graw-Hill US 1996; p. 61-64.
- 7- Deyne D, Cathy SI: The Acute Care of Traumatic Brain Injury. Current Opinion Anaesth 2001;14(5) 475-48.
- 8- Laurer HL, McIntosh TK: Experimental Models of Brain Trauma. Current Opinion Neurol 1999; 12(6): 715-721.
- 9- Klatzo I: Neuropathological Aspects of Brain Edema. J Neuropathol Exp 1967; 26: 1-14.
- 10- Miller JD: Traumatic brain swelling and edema. In Cooper PR (ed): Head injury. Baltimore, Williams and Wilkins 1993; p. 331-353.
- 11- Pollay M: Blood Barrier; Cerebral Edema. Wilkins RH, Rengachary SS(eds): Neurosurgery, Mc Graw Hill, New York, Second Edition, Volume I, 1996; p. 335-340.

- 12- Brightman MW: The anatomic basic of the blood-brain barrier. In Neuwalt EA (ed): Implication of the blood-brain barrier and its manipulation. NY Plenum Medica Book, Volume 1, 1989; p. 53-58.
- 13- Weed LH, Mc Kibben PS: Pressure changes in the cerebrospinal fluid following intravenous injection of solutions of various concentrations. Am J Physiol 1919; 48: p. 512-530.
- 14- Alp H: Beyin Ödemi. Temel Nöroşürürji 1. Ankara 1997; p. 1-15
- 15- Whal M, Utenberg A, Baetmann A, Schilling L: Mediators of Blood – Brain Barrier Dysfunction and Formation of Vasogenik Brain Edema. J Cereb Blood Flow Metab 1988; 8: 621-634.
- 16- Utenberg A, Schmidh W, Whal M, Baetmann A: Role of Leukotrienes as Mediator Compaund in Brain Edema. In Long D (ed) Advences in Neurology NY Raven Press, 1990; p. 211-215.
- 17- Gros PM: Cerebral Histamine: Indications for Neuronal and Vascular regulation. J Cereb Blood Flow Metab 1982; 2: 3-23.
- 18- Hatton J: Pharmacological Treatment of Traumatic Brain Injury: A Review of Agents in Development. CNS Drugs 2001; 15(7): 553-581.
- 19- Demopoulos HB, Flamm E, Seligman M, Pietronigro DD: Oxygen Free Radicals in Central Nervous System Ischemia and Trauma. In Autor AP (ed) Pathology of Oxygen, NY, Academic Press 1982, p. 127-155.
- 20- Harris RJ, Symon L, Branston NM, Bayhan M: Changes in Extracelluler Calcium Activity in Cerebral Ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 1981;1: 203-209.
- 21- Brent JA, Rumack HH: Role of Free Radicals in Toxic Hepatic İnjury I. Free Radicals Biochemistry, Clinical Toxicology 1993; 31: 139-171.
- 22- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric Oxide Release Accounts For The Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. Nature 1987; 327: 524-526.

- 23- Furchgott RF, Zawadzki JV: The Obligatory Role of Endothelial Cells in The Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholin. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- 24- Fridovich L: Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64: 97-112.
- 25- Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine. Second Edition Clarendon Press, Oxford, 1989.
- 26- Halliwell B: Reactive Oxygen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am J Medicine* 1991; 91 (3C): 14-22.
- 27- Packer L: Methods in Enzymology Oxygen Radicals in Biological System. Academic Press Inc, Orlando Florida, 1984.
- 28- Mariotto S, Cuzzolin L, Adami A, DelSoldato P, Suzuki H, Benoni G: Effect of A New Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Nitroflurbiprofen on The Expression of Inducible Nitric Oxide Syntase in Rat Neutrophils. *B J Pharmacol* 1995;115: 225-226.
- 29- Ikeda Y, Long DM: The Molecular Basis of Brain Injury and Edema: The Role of Oxygen Free Radicals. *Neurosurgery* 1990; 27: 1-11.
- 30- Turrens JF: Superoxide Production by The Mitochondrial Respiratory Chain. *Biosci Reports* 1997; 17: 3-8.
- 31- Beckman JS, Liu TH, Hogan EL, Freeman BA, Hsu CY: Oxygen Free Radicals and Xanthine Oxidase in Cerebral Ischemic Injury in Rat. *Soc Neurosci* 1987; 13:1498.
- 32- Saugstad OD: Hypoxanthine as an Indicator of Hipoxia; Its Role in Health and Disease Through Free Radical Production. *Pediatr Res* 1988; 23: 143-150.
- 33- Bralet J, Schreiber L, Bouvier C: Effects of Asidosis and Anoxia on Iron Delocalization From Brain Homogenats. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 979-983.
- 34- Sies H, De Groot H: Role of ROS in Cell Toxicity. *Toxicol Letters*. 1992; 64/65: 547-551.

- 35- Aydın A, Sayal A, Işimer A: Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. GATA yayınları, Ankara, 2001;20: p. 2-71.
- 36- Chada S, Whitney C, Newburger PE: Post-Transcriptional Regulation of Glutathione Peroksidase Gene Expression by Selenium in The HL-60 Human Myeloid Cell Line. Blood 1989; 74: 2535-2541.
- 37- Vinson J, Hsu C, Possanza C, Draek A, Pane D, Davis RA, at all: Lipid Peroxidation and Diabetic Complications Effect of Antioxidant Vitamins C and E. Advances Experimental Medicine and Biology. 1994; 366: 430-432.
- 38- Dökmeci İ: Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel, İzmir, 2000. s. 160
- 39- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD: Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in the Developing Human Central Nervous System. Pediatr Research 1998; 43(1): 40-49.
- 40- Reynolds JEF. Martindale. The Extra Pharmacopoeia: Blood Products Plasma Expanders and Haemostatics.RPS 1996; p 762-763
- 41- Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, Cerami CJ. Effects of Epoetin Alfa on Central Nervous System. Semin Oncol 2001; 28(2): 66-70
- 42- Juul SE: Nonerythropoietic Roles of Erythropoietin in Fetus and Neonate. Clin Perinatol 2000; 3/27: 527-541.
- 43- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y: Effects of Erythropoietin on Neuronal Activity. J Neurochem 1999; 72(6): 2565-2572.
- 44-Digicaylioglu M, Lipton SA: Erythropoietin-Mediated Neuroprotection Involves Cross-Talk Between Jak2 And NF-B Signalling Cascades. Nature 2001; 412: 641-647.
- 45- Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y: Erythropoietin Acts as a Trophic Factor in Neonatal Rat Intestine. J Gastroenterol Hepatol 2001; 49(2): 182-189.
- 46- Brines M, Ghezzi P, Keenan S, De Lanerolle NC, Carla C, Hannelore E: Erythropoietin Prevents Neuronal Apoptosis After

- Cerebral Ischemia and Metabolic Stress. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(19): 10526-10531.
- 47- Yasuda Y, Nagao M, Okano M, et al: Localization of Erythropoietin and Erythropoietin-Receptor in Post Implantation Mouse Embryos. *Develop Growth Differ* 1993; 35: 711-722.
- 48- Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloğlu M, Gure A: Erythropoietin Exerts Neuroprotection in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated C57/BL Mice Via Increasing Nitric Oxide Production. *Neuroscience Letters* 2001; 298: 139-141.
- 49- Wu H, Lee SH, Gao J, et al: Inactivation of Erythropoietin Leads To Defects in Cardiac Morphogenesis. *Development* 1999; 126: 3597-3605
- 50- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P: Erythropoietin Prevents Neuronal Apoptosis After Cerebral Ischemia and Metabolic Stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(27): 4044-4049.
- 51- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al: In Vivo Evidence That Erythropoietin Protects Neurons From Ischemic Damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4635-4640.
- 52- Juul SE, Harcum J, Li Y, et al: Erythropoietin is Present in The Cerebrospinal Fluid of Neonates. *J Pediatr* 1997; 130: 428-430.
- 53- Canbolat O, Fandrey J, Jelkmann W: Effects of Modulators of The Production and Degradation of Hydrogen Peroxide on Erythropoietin Synthesis. *Res Physiol* 1998; 114: 175-183.
- 54- Sirén A-L, Knerlich F, Poser W, Christoph HG, Brück W: Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Human Ischemic/Hypoxic Brain. *Published pnas.online before print* 2001; 10: 1073
- 55- Aun CST: New i.v. Agents. *Br J Anaesth* 1999; 83: 29-41.
- 56- Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ: *Clinical Anesthesiology*, 3rd Ed, USA: McGraw Hill 2001; p.151-77.

- 57- Reves JG, Glass PSA, Lubarsky DA: Non Barbiturate Intravenous Anesthetics. In: Miller RD (Ed.). Anesthesia (5th Ed), NY Churchill Livingstone 2000; p.228-272.
- 58- Sear JW: Continuous infusions of hypnotic agents for maintenance of anaesthesia. In: Kay B. (Ed.) Total Intravenous Anesthesia, Amsterdam: Elsevier Sci Publi 1991; p.15-55.
- 59- Ravussin P: Anesthesia for neurosurgical procedures. In: Prys-Roberts C. (Ed.) Focus On Infusion-Intravenous Anaesthesia. London: Current Medical Literature, 1991; p.168-171.
- 60- Hemelrijk JV, White PF: Intravenous anaesthesia for day-case surgery. In: Kay B, (Ed.) Total Intravenous Anaesthesia, Amsterdam: Elsevier Sci Publi, 1991; p.323-350
- 61- Biebuyck JF, Gouldson R, Nathanson M, White PF, Smith I: Propofol an Update on its Clinical Use. Review Article. Anesthesiology 1994; 81: p.1005-1043.
- 62- Ravussin P: Anaesthesia for neurosurgical procedures. In: Prys-Roberts C. (Ed.) Focus on Infusion-Intravenous Anaesthesia, London: Current Medical Literature, 1991; p.156-164.
- 63- Moss E: Total intravenous anaesthesia and sedation for neurosurgery. In: Kay B, (Ed.) Total Intravenous Anaesthesia, Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1991; p.247-284.
- 64- Mirakhur RK, Eliot P, Stanley JC: Use Of Propofol in Anaesthesia For Ophthalmic Surgery. In: Prys-Roberts C. (Ed.) Focus on Infusion-Intravenous Anaesthesia, Current Medical Literature, 1991; p.134-138.
- 65- Harrison G: Propofol Anaesthesia in Pharmacogenetic States. In: Prys-Roberts C. (Ed.) Focus on Infusion-Intravenous Anaesthesia, Current Medical Literature, 1991; p.186-190.
- 66- Laxenarie MC, Moneret Wautrin DA, Gue ant JL: The Assessment of Possible Anaphylactic Reactions to i.v. Anaesthetic Agents. in: Prys-Roberts C. (Ed.) Focus on Infusion-Intravenous Anaesthesia, Current Medical Literature, 1991; p.191-194.

- 67- Rucguoi M, Camu F: Haemodynamic Effects of Continuous Infusion Anaesthesia and Sedation. In: Kay B, (Ed.) Total Intravenous Anaesthesia. Elsevier Science Publications, 1991; p.151-173.
- 68- De La Cruz A-JP, Zanca A, Carmona JA, De La Cuesta FS: The Effect of Propofol on Oksidative Stress in Platelets From Surgical Patients. *Anesth Analg* 1999; 89: 1050-1055.
- 69- Daskalopoulos R, Korcok J, Farhangkhgoee P, et al: Propofol Protection of Sodium- Hydrogen Exchange Activity Sustains Glutamat Uptake During Oxidative Stress. *Anest Analg* 2001; 93:1199-1204
- 70- Demiryürek AT, Cinel I, Kahraman S, Tecder UM, Göğüş N, Aypar U, Kanzık I: Propofol and Intralipid Interact With Reactive Oxygen Species: A Chemiluminescence Study. *Br J Anesth* 1998; 80: 649-654.
- 71- Sitar SM, Hanifi M, Cechetto D, et al: Propofol Prevents Peroxide-Induced Inhibition of Glutamate Transport in Cultured Astrocytes. *Anesthesiology* 1999; 90:1446-1453.
- 72- Kahraman S, Kilingç K, Dal D, Erdem K: Propofol Attenuates Formation of Lipid Peroxidase in Tourniquet-Induced Ischemia-Reperfusion Injury. *Br J Anesth* 1997; 78: 279-281.
- 73- Antognoni JF, Wang XW, Piercy MBA, Carstens E: Propofol Directly Depresses Lumbar Dorsal Horn Neuronal Responses to Noxious Stimulation in Goats. *Can J Anesth* 2000; 47: 273-279.
- 74- Peters CE, Korcok JBS, Gelb AW, Wilson JX: Anesthetic Concentrations of Propofol Protect Against Oxidative Stress in Primary Astrocyte Cultures Comprasion with Hypotermia. *Anesthesiology* 2001; 94: 313-321.
- 75- Aebi H: Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press: New York and London, 1974; .p 673-677.

- 76- Sun Y, Oberley LW, Ying L: A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- 77- Durak I, Yurtarslani Z, Canbolat O, Akyol O: A Methodological Approach to Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Based on Inhibition of Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction. *Clin Chim Acta* 1993; 214: 103-104.
- 78- Prajda N, Weber G: Malign Transformation Linked Imbalance Decreased XO Activity in Hepatomas. *FEBS Lett* 1975; 59: 245-249.
- 79- Wasowicz W, Neve S, Peretz A: Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction Ph and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clin Chem* 1993; 39: 2522-2526.
- 80- Cortas NK, Wakid NW: Determination of Inorganic Nitrate in Serum and Urine by a Kinetic Cadmium-Reduction Method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
- 81- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 82- Akyol O, Arslanoglu R, Durak I: Activities of Free Radical and DNA Turn-Over Enzymes in Cancerous and Noncancerous Human Brain Tissues. *Redox Rep* 1995; 1: 255-259.
- 83- Weir DL, Goodchild CS, Graham DI: Propofol Effect on Indices of Cerebral Ischemia. *J Neurosurg Anesth* 1989; 1: 284-289.
- 84- Boland A, Delapierre D, Mossay D, Hans P, Dresse A: Propofol Protects Cultured Brain Cells From Iron-Induced Death Comparison With Trolox. *Eur J Pharmacol* 2000; 404: 21-27.
- 85- Hans P, Deby C, Deby-Dupont G, Vrijens B, Albert A, Lamy M: Effect of Propofol on in Vitro Lipid Peroxidation Induced by Different Free Radical Generating Systems: A Comparison With Vitamin E. *J Neurosurg Anesth* 1996; 8: 154-158.

- 86- Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- 87- Williams LR: Oxidative Stress, Age-Related Neurodegeneration, and The Potential for Neurotrophic Treatment. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 71: 55-73.
- 88- Olanow CW: A Radical Hypothesis for Neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993; 16: 439-444.
- 89- Richardson JS: Free Radicals in The Genesis of Alzheimer's Disease. *Ann NY Acad Sci* 1993; 695: 73-76.
- 90- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G: Radical Aging in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci* 1995; 184: 172-176.
- 91- Halliwell B, Gutteridge JMC: Biologically Relevant Metal Ion-Dependent Hydroxyl Radical Generation An Update. *FEBS Lett* 1992; 3071: 108-112.
- 92- Mattson MP: Modification of Ion Homeostasis by Lipid Peroxidation: Roles in Neuronal Degeneration and Adaptive Plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 212: 53-57.
- 93- Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, Akyol O: Testicular Nitric Oxide Levels After Unilateral Testicular Torsion-Detorsion in Rats Pretreated With Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Urol Res* 2000; 28: 360-363.
- 94- Evans PH: Free Radicals in Brain Metabolism and Pathology. *Br Med Bull* 1993; 49: 577-587.
- 95- Murphy PG, Bennett JR, Myers DS, Davies MJ, Jones JG: The Effect of Propofol Anaesthesia on Free Radical-Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes. *Eur J Anaesthesiol* 1993; 10: 261-266.
- 96- Marthy-Hartert M, Deby-Dupont G, Hans P, Deby C, Lamy M: Protective Activity of Propofol, Diprivan and Intralipid Against Active Oxygen Species. *Mediat Inflamm* 1998; 7: 327-333.

- 97- Basu S, Mutschler DK, Larsson AO, Kiiski R, Nordgren A, Eriksson MB: Propofol (Diprivan-EDTA) Counteracts Oxidative Injury and Deterioration of The Arterial Oxygen Tension During Experimental Septic Shock. *Resuscitation* 2001; 50: 341-348.
- 98- Mantle D, Eddeb F, Areni K, Snowden C, Mendelow AD: Comparative Antioxidant Potential of Anaesthetics and Perioperative Drugs in Vitro. *Clin Chim Acta* 2000; 301: 41-53.
- 99- Baud L, Ardaillou R: Involvement of Reactive Oxygen Species in Kidney Damage. *Br Med Bull* 1993; 49: 621-629.
- 100- Rangan U, Bulkley GB: Prospects for Treatment of Free Radical-Mediated Tissue Injury. *Br Med Bull* 1993; 49: 700-708.
- 101- Weight SC, Furness PN, Nicholson ML: Nitric Oxide Generation is Increased in Experimental Renal Warm Ischaemia-Reperfusion Injury. *Br J Surg* 1998; 85: 1663-1668.
- 102- Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra L, Lentsch AB, Ward PA: Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-258.
- 103- Jull SE: Nonerythropoietic Roles of Erythropoietin in The Fetus and Neonate. *Clin Perinatol* 2002; 7: 527-541.