

## Sıçan Serebellumunda Demir Nörotoksitesine Karşı Vitamin E'nin Koruyucu Etkisi

Ramazan KOZAN<sup>1</sup>, M. Ömer BOSTANCI<sup>2</sup>, Bülent AYAS<sup>3</sup>, Ali ASLAN<sup>4</sup>, Faruk BAĞIRICI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, HATAY

<sup>2</sup> Hitit Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Fizyoloji Anabilim Dalı, ÇORUM

<sup>3</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

<sup>4</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, intraserebroventriküler olarak verilen demirin, sıçan serebellar Purkinje hücrelerinde oluşturduğu nörotoksitesine karşı yağda çözülebilen güçlü bir antioksidan olan vitamin E'nin ( $\alpha$ -tokoferol) etkisini araştırdık.

**Gereç ve Yöntem:** Sıçanlar, kontrol, demir ve demir+vitamin E grupları olmak üzere üç gruba ayrıldı. Demir ve demir+vitamin E gruplarındaki sıçanlara intraserebroventriküler olarak demir ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 200 mM, 2.5  $\mu\text{l}$ ) verildi. Demir+vitamin E grubundaki sıçanlara operasyonu takiben on gün süreyle 100 mg/kg/gün dozunda vitamin E intraperitoneal olarak verildi. Onuncu günün sonunda, bütün gruplardaki hayvanlar intrakardiyak yolla perfüze edildikten sonra dekapite edildiler. Beyin dokuları çıkarılarak standart histolojik doku takibi uygulandı. Toplam Purkinje hücre sayıları tarafsız sayım metodu olan stereolojik yöntemle hesaplandı.

**Bulgular:** Ortalama toplam Purkinje hücre sayıları, kontrol grubunda  $490584 \pm 13286$ ; demir grubunda  $331497 \pm 10764$  ve demir+vitamin E grubunda  $412118 \pm 15842$  olarak bulundu. Demir ve demir+vitamin E grupları karşılaştırıldığında, vitamin E'nin demirin indüklediği Purkinje hücre kaybını %32.4'den %15.9'a düşürdüğü bulundu ( $p < 0.01$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları, vitamin E'nin sıçan serebellumunda demirin indüklediği Purkinje hücre kaybını dikkate değer ölçüde geri çevirdiğini gösterdi. Bu nöroprotektif etkinin, vitamin E'nin serbest radikaller üzerine antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Vitamin E, demir, Purkinje hücresi, stereoloji

### ABSTRACT

#### Protective Effect of Vitamin E against Iron -induced Neurotoxicity in the Rat Cerebellum

**Objective:** In this study, we investigated the effect of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), a potent fat-soluble antioxidant, against intracerebroventricular-injected iron-induced neurotoxicity on the cerebellar Purkinje cells in rats.

**Materials and Methods:** Rats were divided into three groups: control, iron and iron+vitamin E groups. Rats in the iron and iron+vitamin E groups received intracerebroventricular iron ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 200 mM, 2.5  $\mu\text{l}$ ), while those in iron+vitamin E groups were intraperitoneally injected with vitamin E (100 mg/kg/day) once a day after the operation for 10 days. After 10 days, all rats were perfused intracardially and then sacrificed. Brain tissues were removed and standard histological techniques were performed. The total numbers of Purkinje cells were estimated using unbiased stereological techniques.

**Results:** Means of the total numbers of Purkinje cells in the cerebellum were estimated as  $490584 \pm 13286$ ,  $331497 \pm 10764$ ,  $412118 \pm 15842$  in the control, iron and iron+vitamin E groups, respectively. Comparison between iron and iron+vitamin E groups revealed that vitamin E significantly attenuates the iron-induced neuron loss from 32.4% to 15.9% ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** Findings of the present study show that  $\alpha$ -tocopherol considerably reverses iron-induced Purkinje cell loss in cerebellum. It is thought that this effect may be due to the scavenging activity of vitamin E on free radicals.

**Key words:** Vitamin E, Iron, Purkinje cell, stereology

**D**emir, insan vücudunda pek çok metabolik ve biyokimyasal olayların gerçekleşmesi için esansiyel bir mineraldir. Hemoglobinin, miyoglobülin gibi moleküllerin ve katalaz, sitokrom oksidaz ve peroksidaz gibi enzimlerin sentezinde önemli rol oynar. Kontrolsüz demir ilaçlarının kullanımına bağlı akut ve kronik zehirlenmelerde, aşırı kan transfüzyonunda ve bir genetik metabolizma hastalığı olan hemokromatoziste vücutta demirin aşırı miktarda biriktiği bildirilmiştir

(1). Bununla birlikte, demir beyinde substansia nigra, globus pallidus ve serebellumun gri maddesi gibi bazı alanlarda en fazla bulunan metallere biridir (2). Ayrıca, beyin demir metabolizması, demirin bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilgili olduğunun bilinmesi üzerine giderek artan bir araştırma alanı haline gelmiştir. Örneğin, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz ve Friedreich ataksisi gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta beyinde demir miktarının yükseldiği tespit edilmiştir (3). Daha önceki yap-

<sup>a</sup> Yazışma Adresi: Dr. Ramazan KOZAN, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, HATAY

\*Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 31-Ağustos 3 Eylül 2004, KONYA

Tel: +90 326 2142636

Fax: +90 326 2144977

e-mail: drkozan@hotmail.com

miş olduğumuz çalışmalarda intraserebroventriküler olarak injekte edilen demirin serebellumdaki Purkinje hücrelerinde ve hipokampustaki piramidal hücrelerde hasara neden olduğu gösterilmiştir (4,5). Beyindeki demir miktarının artışının oksidatif stresi indüklediği (6,7) ve bu durumun da nöron ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (3, 8).

Hücrede meydana gelen çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı antioksidanlar tarafından hücre korunmaktadır. Antioksidan sistem, serbest radikallerin etkilerini farklı basamaklarda önlemeye, sınırlamaya veya kısmen tamir etmeye çalışır (9). Bu antioksidan moleküllerin en önemlilerinden birisi de yağda eriyip hücre zarında kolaylıkla geçiş yapabilen vitamin E'dir ( $\alpha$ -tokoferol). Hücre membranlarının bütünlüğünün korunması vitamin E'nin en önemli fonksiyonlarından birisidir. E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol) serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olan lipid peroksidasyon reaksiyonunun ilerlemesini önleyen major zincir kırıcı bir antioksidandır (10,11). Bununla birlikte,  $\alpha$ -tokoferol non-enzimatik ve hızlı antioksidan reaksiyonlar oluşturur ve eğer serbest oksijen radikalleri oluşmuş ise onları da nötralize eden en güçlü antioksidanlardan biridir (12,13). Eksikliğinde hücrelerin peroksitlere karşı duyarlılığı artar ve anormal hücre membranları oluşur, alyuvarlarda yaşam süresi kısalmır. E vitamini seviyesindeki düşüklüğün spinoserebellar dejenerasyona da sebep olduğu belirtilmiştir (14). Ayrıca, penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan sıçanlarda vitamin E epileptik aktivitenin frekansını azaltarak antiepileptik etki göstermiştir (15).

Serebellum, periferdeki çeşitli reseptörlerden beyine gelen bilgi ile beynin bu bilgilere karşı oluşturduğu cevapları karşılaştırarak hareketlerin düzenlenmesinden sorumludur. Bu fonksiyonu yerine getiren serebellum korteksinin tek çıkışı Purkinje hücreleridir. Dolayısıyla, serebellumun fonksiyonlarında Purkinje hücrelerinin çok önemli bir yeri olmakla birlikte bu hücreler alkol toksisitesi ve iskemi gibi çeşitli patolojik durumlara da oldukça duyarlıdır (16,17). Ayrıca, daha önce yapmış olduğumuz bir çalışmada da, intraserebroventriküler olarak verilen demirin, sıçan serebellar Purkinje hücrelerinde nörotoksite oluşturduğu gösterildi (5). Sunulan çalışmada, intraserebroventriküler olarak verilen demirin, sıçan serebellar Purkinje hücrelerinde oluşturduğu nörotoksiteye karşı hücre membranlarının korunmasında güçlü bir antioksidan olan vitamin E'nin nöroprotektif etkisinin olup olmadığını araştırıldı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hayvanlar

Çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alınan, ağırlıkları  $210 \pm 25$ g olan Albino Wistar erkek sıçanlar kullanıldı. Bu çalışmada yapılan bütün uygulamalar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun protokollerine uygun olarak yapılmıştır. Sıçanlar kontrol, demir ve demir+E vitamini grubu olarak 3 gruba ayrıldı (n=10). Deneylere başlamadan bir hafta önce alınan sıçanlar tek tek kafeslere yerleştirildikten sonra  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 12 saat aydınlık-karanlık (07.00-19.00) ortamda istedikleri kadar yem ve su alabilecekleri şekilde aynı laboratuvar ortamında bakımları yapıldı.

### Operasyon ve Histolojik Prosedürler

Operasyondan 12 saat önce aç bırakılan sıçanlarda operasyonun hemen öncesinde, ketamin (100mg/kg) ve ksilasin 10 mg/kg intraperitoneal (i.p.) olarak yapılan injeksiyon ile

anestezi oluşturuldu. Sıçanlar steriotaksik cihaza sabitlendikten sonra kafa derileri elektrikli koter ile (Ellman Surgitron) orta hattan rostro-kaudal yönde 2cm kesilerek açıldı. Kafa kemiği üzerinde bulunan tendon ve fasyalar uzaklaştırıldıktan sonra, Bregma net olarak görüldü. Sol lateral ventriküle uygun olacak şekilde Bregmanın 2mm lateralinde 0.6mm posteriöründe 1mm çapında bir delik açıldı (18). Buradan 4.2mm derinliğe kadar Hamilton mikroenjektörü ile  $0.5 \mu\text{l}/\text{dk}$  hızında  $2,5 \mu\text{l}$ ,  $200 \text{mM}$ 'lık  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi, demir ve demir+E vitamini grubundaki sıçanlara intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak verildi (19). Kontrol grubundaki sıçanlara ise aynı hacimde serum fizyolojik, i.c.v. olarak verildi. Enjeksiyonu takiben insizyon yeri dikilerek %10% povidon iyot ile temizlendi ve hayvanlar kafeslerine yerleştirildi. Operasyondan sonra sıçanlar 10 gün süreyle yaşatıldı. Bu süre boyunca demir+E vitamini grubundaki hayvanlara  $100 \text{mg}/\text{kg}/\text{gün}$  dozunda E vitamini i.p. olarak verildi (20). Kontrol ve demir grubundaki sıçanlara ise aynı hacimde serum fizyolojik i.p. olarak verildi. On günlük sürenin sonunda, hayvanlar derin üretran anestezisi altında %10'luk formaldehid ve salin ile intrakardiyak yolla perfüze edildi. Perfüzyon tamamlandıktan sonra beyin dokuları çıkartılarak, beyin korteksi ve serebellum bir birinden ayırıldı ve serebellumlar standart histolojik doku takibi uygulandıktan sonra paraplast bloklara gömüldü. Mikrotom ile (Leica RM 2135), horizontal planda, bloklardan  $40 \mu\text{m}$ 'lik kesitler alınarak kresil violet ile boyandı.

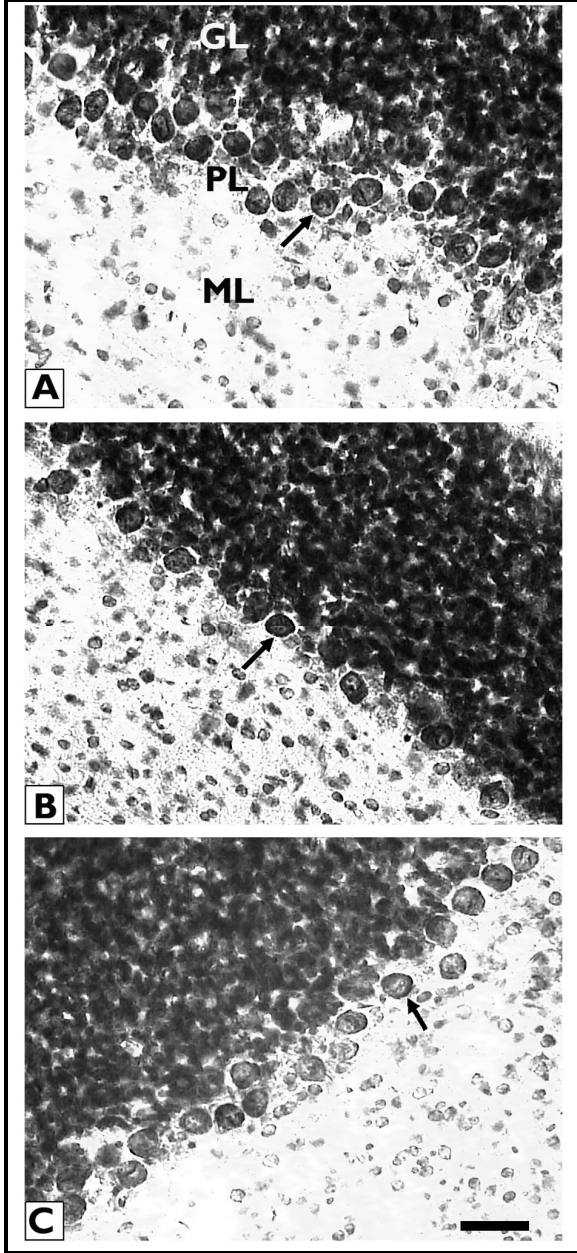
### Kesit örnekleme ve stereolojik analiz

Daha önceki yapılan çalışmalar da kullanılarak Purkinje hücre tabakasının hücresel yapı özellikleri belirlendi (5,21). Sistematik olarak yapılan örneklemede (ssf:1/7) her yedi kesitten bir tanesi alındı ve bu şekilde her hayvandan ortalama 14-16 cerebellum kesiti elde edildi. Serebellumdaki toplam Purkinje hücre sayıları ve analizleri bilgisayar destekli stereolojik görüntü analiz cihazında optik parçalama metodu kullanılarak hesaplandı (12). Hücre sayım alanlarının belirlenmesi ve sınırlarının çizilmesi CAST Grid stereolojik analiz yazılımı (Olympus, Denmark) kullanılarak yapıldı. Her bir kesitteki hücre sayıları yaklaşık 500 hücre sayacak şekilde örnekleme yapılarak elde edildi. Randomize olarak seçilen serebellum kesitinde x-y basamaklarında  $200 \times 200 \mu\text{m}$  adımlarla örnekleme yapıldı ve bu seçilen alanlar  $100 \times$ 'lük objektifde optik disektör probuda kullanılarak analiz edildi. Optik disektör sayımında tarafsız olarak ayarlanmış olan %20'lik sayım çerçevesi kullanıldı. Böylece, örnekleme yapılan alanın fraksiyonu (asf)  $587/40.000 \mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (5).

Optik parçalama metodunun son basamağında ise örnekleme yapılan yerin kesit kalınlığı belirlenmektedir. Kesitin üst kısmında  $5 \mu\text{m}$  üst güvenlik zonu bırakıldıktan sonra  $10 \mu\text{m}$ 'lik disektör yüksekliği ayarlanan bölgede sayım yapılmaktadır. Bütün bu tip ölçümler stereoloji sistemine uyumu sağlanmış dijital bir mikrokator (Heidenhain, Germany) ile yapıldı. Bundan dolayı, en son örnekleme basamağı genellikle kalınlık örnekleme fraksiyonu olarak (tsf) olarak adlandırılır ve  $[\text{Disektör yüksekliği}]/[\text{ortalama kesit kalınlığı}]$  ile hesaplanır. Toplam kesitlerin ortalama kalınlığı  $28.25 \pm 2.06 \mu\text{m}$  olarak hesaplandı. Bütün kesitlerdeki örnekleme tamamlandıktan sonra örneklenen Purkinje hücreleri disektör partikülleri (Q-) olarak hesaplandı. Toplam Purkinje hücre sayısı (N) olarak kabul edilerek aşağıdaki formül ile hesaplandı;  $N = [1/\text{ssf}] * [1/\text{asf}] * [1/\text{tsf}] * \Sigma Q-$

Elde edilen veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v12.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel

açından değerlendirildi. Toplam ortalama Purkinje hücre sayısının analizi için post hoc Tukey testi kullanıldı. Grafik ve metin içerisinde kullanılan deney gruplarına ait değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Testlerden elde edilen sonuçlara göre p değeri 0.05'in altında olan farklılıklar anlamlı kabul edildi.



**Şekil 1.** Serebellumdaki Purkinje hücrelerinin mikrofotografı: (A) Kontrol, (B) demir ve (C) demir+vitamin E grubu. Fotoğraf A'nın üzerinde serebellumun hücre tabakaları gösterilmektedir (GL: granüler tabaka, PL: Purkinje tabakası, ML: moleküler tabaka). Fotoğraflardaki oklar Purkinje hücrelerini göstermekte olup, C'deki bar 40  $\mu$ m'yi ifade etmektedir.

## BULGULAR

Kontrol, demir ve demir+E vitamini gruplarına ait serebellar Purkinje hücre sayılarındaki değişimin mikrofotografı Şekil

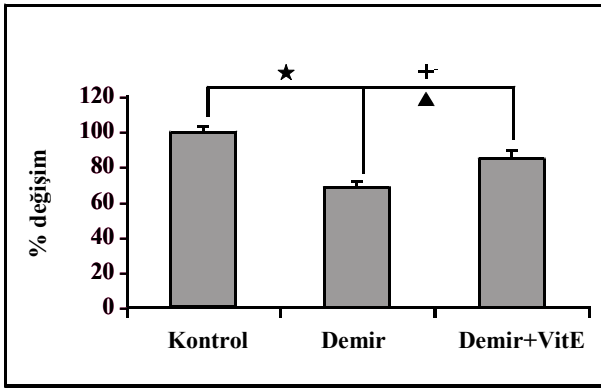
1'de gösterilmiştir. Serebellumdaki Purkinje hücre sayıları ortalama; kontrol grubunda  $490584 \pm 13286$ ; demir grubunda  $331497 \pm 10764$ ; demir+E vitamini grubunda  $412118 \pm 15842$  olarak bulundu. Gruplara ait varyasyon katsayısı (CV) ve hata katsayısı (CE) sırasıyla kontrol grubu için 0.04, 0.06, demir grubu için 0.09, 0.05 ve demir+vitamin E grubu için 0.06, 0.05 olarak bulundu.

Kontrol, demir ve demir+E vitamini gruplarına ait serebellumdaki ortalama toplam Purkinje hücre sayılarındaki yüzde değişim Şekil 2'de gösterilmiştir. Demir grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, serebellumdaki Purkinje hücre sayısının %32.4 oranında azaldığı tespit edildi ( $p < 0.001$ ), (Şekil 2). Demir+vitamin E grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Purkinje hücre sayısındaki azalmanın %15.9 oranında olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2). Demir grubuyla demir+E vitamini grubu karşılaştırıldığında ise vitamin E'nin demirin neden olduğu hücre kaybını %32.4'den %15.9'a indirdiği ve serebellumdaki Purkinje hücrelerini demirin toksik etkisinden koruduğu anlaşıldı. ( $p < 0.01$ ), (Şekil 2). Elde edilen bu bulgular, vitamin E'nin demirin serebellumda oluşturduğu toksik hasarı azaltabileceğini göstermektedir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, i.c.v olarak yüksek dozda verilen demirin sıçan serebellar Purkinje hücre kaybı üzerine bir antioksidan olan vitamin E'nin etkisini inceledik. Serebellumdaki toplam Purkinje hücre sayısı sistematik rastgele örnekleme ile tarafsız bir sayım metodu olan stereolojik yöntemle tespit edildi. Stereolojik metodlar, kişisel ve metodolojik sebeplerden kaynaklanan taraflılığı etkin bir şekilde azaltır ve bundan dolayı beyinin belirli bölgelerindeki nöron sayılarının doğru ve tarafsız bir şekilde tespit edilmesine izin verir. Modern stereolojik hücre sayım yaklaşımlarında, sayım yapılan bölgedeki bütün hücreler eşit oranda örnekleme katılabilirliğine sahiptir. Bu durum toplam nöron sayısının tarafsız hesaplanmasını ve örnekleme sağlar (22). Bundan dolayı, bu çalışmada Purkinje hücre sayılarının hesaplanmasında bu metodu tercih ettik. Elde edilen bulgular, demirin serebellumdaki Purkinje hücre sayısını %32.4 oranında azalttığı, E vitamini ile yapılan tedavinin ise demirin neden olduğu hücre kaybını %32.4'den %15.9'a indirdiğini gösterdi. Bu çalışma, demirin neden olduğu Purkinje hücre kaybı üzerine vitamin E'nin nöroprotektif etkisini gösteren ilk stereolojik çalışmadır.

Demir normal beyin fonksiyonlarının korunmasında önemli bir rol oynar. Ancak demir birikimi veya hidroksil radikal yapılarının artması bazı nörodejeneratif hastalıkların yıkıcı etkileriyle yakından ilgilidir (23). Demir, lipid peroksidasyonu ve hücre hasarı indüklemek için yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Ferro ( $Fe^{2+}$ ) ve ferrik ( $Fe^{3+}$ ) demir Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikallerini oluşturur ve hücre hasarına neden olur (24). Sunulan çalışmada, oksidatif stresi indüklemek için beyin demir miktarı deneysel olarak artırıldı. Demirin i.c.v. olarak enjeksiyonu sonucu sağ ve sol hipokampus demir konsantrasyonlarının birbirinden farklı olmadığı bununda muhtemelen demir moleküllerinin bütün beyin bölgelerine eşit oranda dağılımından kaynaklandığı belirtilmiştir (25).



**Şekil 2.** Serebellumdaki toplam Purkinje hücre sayılarındaki yüzde değişim (n=10). Kontrol grubuna göre,\* p<0.001 ve p<0.05; demir+vitamin E grubuna göre p<0.01. Bütün sonuçlarda ortalama ±SEM değerleri kullanıldı.

Ayrıca demir epileptik aktiviteyi indüklemek için de kullanılan bir maddedir. Meyerhoff ve ark. (26) sıçanlarda deneysel olarak epilepsi oluşturmak için demir klorürü 10µl hacim içinde 600mM konsantrasyonda intrakortikal olarak injekte etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, demir injeksiyonu sonunda 10 günlük postoperatif dönemde sıçanlarda her hangi bir epileptik davranış gözlenmedi. Bu çalışmada 2.5µl hacim içinde 200mM demir klorür (i.c.v.) injekte edildi. Bu dozun epileptik aktivitenin tetiklenmesi için yeterli olmadığı daha önceki çalışmalarda da belirtilmiştir (25). Demir tuzlarının suda çözünmüş solüsyonlarının subpial injeksiyonunun da sıçanlarda serbest radikal oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (19).

Merkezi sinir sistemi, yapısında bulunan endojen ve eksojen antioksidan sistemlerin diğer dokulara göre daha zayıf olmasından dolayı serbest radikallerin indüklediği oksidatif strese karşı daha fazla duyarlıdır (27). Ayrıca, beyin dokusu demirin indüklediği serbest radikal oluşmasına kolaylıkla katılabilen oldukça fazla miktarda poliansature yağ asidi içermektedir. Bizim çalışmamızdaki veriler, serbest haldeki demir klorür injeksiyonunun Purkinje hücre sayısında azal-

## KAYNAKLAR

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 940-959.
2. Hill JM, Switzer RC. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 1984;11:595-603
3. Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation of iron in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 1998; 27:257-267.
4. Bostancı MO, Bağırıcı F. Nitric oxide synthesis inhibition attenuates iron-induced neurotoxicity: A stereological study. *Neurotoxicology* 2008a; 29: 130-135.
5. Kozan R, Bostancı MÖ, Sefil F ve ark. Sıçan Serebellumunda Demirin İndüklediği Purkinje Hücre Kaybına Nikardipinin Koruyucu Etkisi: Stereolojik Bir Çalışma. *Fırat Tıp Dergisi* 2008; 13: 167-170.
6. Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. The role of monoamine oxidase, iron-melanin interaction, and intracellular calcium in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1990; 32: 239-248.

maya neden olduğunu ve eksojen olarak uygulanan vitamin E'nin bu hasarı anlamlı olarak azalttığını göstermektedir. Bizim çalışmamızla oldukça yakından ilgili olarak, Heaton ve ark. (28) neonatal ve postnatal dönemde yüksek doz etanole maruz kalan ratlardaki serebellar Purkinje hücre kaybına karşı vitamin E'nin koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, sıçan hipokampal nöron kültüründe β-amiloidin indüklediği toksisite ve cerebellar granüler hücre kültüründe glutamatın indüklediği sitotoksitenin α-tokoferol tarafından önlediği bildirilmiştir (29,30)

Eksojen bir antioksidan olan vitamin E, bu etkilerini esas olarak lipid peroksidasyon zincirinin ilerlemesini engelleyerek göstermektedir (31). Farklı konsantrasyonlarda kronik etanol alan sıçanların beyin sapı lipid peroksidasyonunu gösteren TBARS seviyelerinde artma, antioksidan sistemin bir göstergesi olan glutasyon (GSH) seviyelerinde ise azalma olduğu bulunmuştur (20). Aynı çalışmada, vitamin E'nin (100mg/kg/gün, i.p.) etanolün oluşturduğu bu toksik etkileri anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (20). Ayrıca, mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre zarlarının fosfolipitleri α-tokoferole afinite gösterir ve vitamin bu noktalarda yoğunlaşır. Bundan dolayı mikrozomal membranlardaki vitamin E miktarı perokside edici ajanların oluşturduğu hasara karşı korunma kapasitesinin belirlenmesinde katkı sağlar (32). Bütün bu veriler dikkate alındığında, vitamin E'nin Purkinje hücrelerini koruyucu etkisinin en muhtemel mekanizmasının, vitamin E'nin antioksidan özelliği ile demirin neden olduğu hücre hasarını azaltması olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sıçanlara i.c.v. olarak verilen demir klorürün (FeCl<sub>3</sub>), serebellumdaki Purkinje hücrelerinin ölümüne neden olduğu ve vitamin E'nin Purkinje hücrelerini, demirin zararlı etkilerinden koruduğu tarafsız bir sayım metodu olan stereolojik yöntem ile ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Fonu tarafından desteklenmiştir.

7. Pu YM, Wang Q, Qian ZM. Effect of iron and lipid peroxidation on development of cerebellar granule cells in vitro. *Neuroscience.* 1999; 89: 855-861.
8. Thompson KJ, Shoham S, Connor JR. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 2001; 15:155-164.
9. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004; 44: 275-295.
10. Pryor WA: Free radicals in autoxidation and in aging. Ed. Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TF, NY Raven Press, New York 1984; 13-41.
11. Esterbauer H, Schmidt R, Hayn M. Relationships among oxidation of low-density lipoprotein, antioxidant protection, and atherosclerosis. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 425-456.
12. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The Am J Med* 1994; 26:5-13.
13. Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, et al. New perspectives on vitamin E: sgamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:1-15.

14. Cellini E, Piacentini S, Nacmias B, et al. A family with spinocerebellar ataxia type 8 expansion and vitamin E deficiency ataxia. *Arch Neurol* 2002; 59:1952-1953.
15. Kozan R, Ayyıldız M, Yildirim M, et al. The influence of ethanol intake and its withdrawal on the anticonvulsant effect of  $\alpha$ -tocopherol in the penicilin induced epileptiform activity in rats. *Neurotoxicology* 2007; 28: 463-470.
16. Bonthius DJ, Bonthius NE, Napper RM, et al. Purkinje cell deficits in nonhuman primates following weekly exposure to ethanol during gestation. *Teratology* 1996; 53: 230-236.
17. Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, et al. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* 2002; 89: 331-359.
18. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th Ed. Academic Press. Inc., CA, USA. 1998.
19. Willmore LJ, Hiramatsu M, Kochi H et al. Formation of superoxide radicals after FeCl<sub>3</sub> injection into rat isocortex. *Brain Res* 1983; 277: 393-396.
20. Ađar E, Bořnak M, Amanvermez R, et al. The effects of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. *NeuroReport* 1999; 10: 1799-1801.
21. Gundersen HJ (). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimator and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc* 1986; 143: 3-45.
22. Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience, *Neuroscience* 2005; 130: 813-831.
23. Moos T. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* 2002; 49:279-301.
24. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation, *J Biol Chem* 1986; 261: 10282-10289.
25. Bostanci MO, Bagirici F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 2008b; 76: 57-62.
26. Meyerhoff JL, Lee JK, Rittase BW, et al. Lipoic acid pretreatment attenuates ferric chloride-induced seizures in the rat. *Brain Res* 2004; 1016:139-144.
27. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerativediseases. *Neurobiol Aging* 2002; 23:795-807.
28. Heaton MB, Mitchell JJ, Paiva M. Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24:512-518.
29. Goodman Y, Mattson MP. Secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol* 1994; 128: 1-12.
30. Ciani E, Groneng L, Voltattorni M, et al. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res* 1996; 728: 1-6.
31. Stocker R and Frei B. Endogenous Antioxidant Defenses in Human Blood Plasma. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, H. Sies, ed. Academic Press, Orlando, FL, 1991; 213-243.
32. Leibler PC. The rol of methabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23:147-169.

*Kabul Tarihi: 01.02.2009*