

PENUMBRAL BEYİN İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDA PLAZMİK VE LİZOSOMAL MEMBRAN STABİLİTESİ, ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ETKİLENİR Mİ ?

Hüray İŞLEKEL^{*}, Sertaç İŞLEKEL^{**}, Gül GÜNER^{*}, Nurten SAYDAM^{*}

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı^{*}
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı^{**}

ÖZET

Bu çalışmada sıçan beyninde penumbra benzeri iskemik koşullar oluşturularak, değişik reperfüzyon süreleri sonunda beyin dokusunda; lipid peroksidasyonu, organel membran stabilitesi ve temel antioksidan enzimler incelendi. Deney gruplarında lizozomal enzimlerden katepsin L ve asid fostatazin, supernatan fraksiyonlarındaki aktivitelerinin lizozomdan zengin fraksiyonlarındaki aktivitelerine oranları ve tiobarbitürik asid ile reaksiyona giren madde değerleri sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı. Superoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz aktiviteleri hemen tüm deney gruplarında, sham grubuna göre istatistiksel olarak azalmış bulundu ($p < 0.05$). Katalaz aktiviteleri ise tüm deney gruplarında sham grubuna oranla yükselmiş olarak belirlendi ($p < 0.01$). Sonuç olarak, penumbral iskemî-reperfüzyon süreci beyin dokusunda lipid peroksid içeriği ve lizozomal membran stabilitesi açısından değişikliğe neden olmazken, antioksidan enzim aktivitelerinin büyük çoğunluğu azalmakta, böylece doku serbest radikal aracılı hasara karşı duyarlı hale gelmektedir.
Anahtar sözcükler: *Beyin iskemî-reperfüzyonu, penumbra, serbest radikal, lizozomal enzim, antioksidan enzim.*

SUMMARY

In this investigation, penumbra like ischemic conditions were established in rat brain. At the end of various reperfusion periods lipid peroxidation, organelle membrane stability and major antioxidant enzymes were evaluated. No statistically discernible differences were found between the experimental groups and the sham operated animals concerning the tiobarbituric acid reactive substance levels and the activity ratios of supernatant fraction to the lysosome enriched fraction for lysosomal enzymes cathepsin L and acid phosphatase. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were decreased in almost all experimental groups in comparison to the sham group ($p < 0.05$). Catalase activities were observed as increased compared to the sham group ($p < 0.05$). Our data clearly demonstrate that; while penumbral ischemia-reperfusion does not cause any change in lipid peroxide content and lysosomal membrane stability in brain tissue, most of the antioxidant enzyme capacity diminishes leading the tissue more vulnerable to free radical induced injuries
Key words: *Brain ischemia-reperfusion, penumbra, free radical, lysosomal enzymes, antioxidant enzymes.*

Son yıllarda vasküler hastalıkların önlenmesi konusunda gelişmeler olmasına karşın, farklı etyolojilere bağlı olarak ortaya çıkan global veya lokal beyin iskemisi, halen önemli bir morbidite ve ...ortalite nedenidir. Her iki iskemî tipinde de iskeminin derinliği, süresi ve ardından gelen reperfüzyonun etkilerine bağlı olarak beyin dokusu nöronlardaki ilımlı metabolik değişikliklerden,

hücre ölümüne kadar giden farklı derecelerde hasara uğramaktadır. Serebral iskemî tedavisinde amaç; infarkta bağlı oluşan geri dönüşümsüz nekroza uğramış nöronları kurtarmaktan çok, bu bölgenin yakın çevresinde yer alan, azalmış kan akımlı, membran potansiyellerinin ve iyon dengesinin korunduğu, riskli iskemik bölge şeklinde tanımlanan penumbral iskemik nöronları

korumaktır (1,2,3,4). Reaktif oksijen radikalleri, beyinde iskemi-reperfüzyon sürecinde, özellikle postiskemik reperfüzyon döneminde gelişen ve birçok nörolojik fonksiyon bozukluğuna yol açan hasarlardan birinci derecede sorumlu tutulmaktadır (5,6,7,8,9). Reaktif oksijen radikalleri hücre ve organel membranları düzeyinde lipid peroksidasyonu ve DNA yapısında baz değişiklikleri ile hücre harabiyetine neden olmaktadır. Özellikle lizozom membran stabilitesinin enzimatik lipoliz ve lipid peroksidasyonu ile bozulmasının, lizozomal hidrolitik ve proteolitik enzimlerin serbestleşmesine, sitoplazmik aktivitelerinin artmasına ve dolayısıyla hücre harabiyetinin hızlanmasına neden olduğuna ilişkin görüşler bulunmaktadır. Bu nedenle katepsinler ve asid fosfataz gibi lizozomal enzimlerin lizozom içi ve sitoplazmik konsantrasyonlarının birbirlerine oranları, hücre içi serbest radikal aktivitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (10,11,12). Bunun yanısıra lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan aldehidlerin ve serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldıran süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerin saptanması, dokudaki iskemi-reperfüzyon hasar düzeyinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır (13,14,15).

Farklı deneysel global veya fokal beyin iskemi reperfüzyon modellerinde, çeşitli antioksidan enzimler ve radikal zincir reaksiyon ürünlerinin saptanması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (16,17). Bununla birlikte farmakolojik tedavi ile

kurtarılabilir alan olarak kabul edilen penumbra bölgesinin hasarını biyokimyasal yönden detaylı olarak değerlendiren ve beyin iskemi reperfüzyon hasarında lizozomal enzimlerin lizozom dışına sızma oranlarını inceleyen bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Bu çalışmada, insana uygun model olması nedeniyle seçilen sıçan beyinde iskemi derinliği SSEP (somatosensoriel evoked potentials) ile monitorize edilerek, dört damar oklüzyonu ile, kısa süreli beyin tümünü kapsayan, global penumbral iskemi oluşturulması ve değişik reperfüzyon süreleri sonunda beyin dokusunda serbest oksijen radikal etkilerinin, radikal zincir reaksiyon ürünleri (Tiyobarbitürik asid ile reaksiyona giren maddeler =TBARS), katepsin L, asid fosfataz gibi lizozomal enzim aktivitelerinin süpernatant fraksiyonlarının, lizozomdan zengin fraksiyonlarına oranları, ve SOD, GSH-Px, katalaz gibi antioksidan enzimler aracılığı ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Modeli ve Grupları

Deneysel işlemler için Sprague Dawley cinsi 45 adet erkek sıçan (265±30g.) kullanıldı. İlk kez Pulsinelli (18) tarafından tanımlanan ve sıçan beyinde iskemi oluşturmak üzere geliştirilen dört damar oklüzyon modeli SSEP yardımı ile, penumbra benzeri koşullar oluşturmak üzere modifiye edildi (19).

Sıçanlara intraperitoneal Ketamine (25 mg/kg) ve Acepromazine maleate (10 mg/kg) enjeksiyonu ile

anestezi uygulandı. Her iki vertebral arter birinci servikal vertebra düzeyinde koter ile yakıldı ve beyin dokusu içine SSEP kayıt elektrodu yerleştirildi. 24 saat sonra sıçanlara tekrar anestezi verilerek femoral artere kateter yerleştirildi. Arteriel basınç (Petas, İzmir, Turkey) ve kan gazları (Nova-Stat 9) izlendi. Vücut ısısı bir lamba ile 37,5-38 °C da sabit tutuldu. Her iki arteria karotis kommünis izole edilerek vasküler klip ile kapatılmaya hazır hale getirildi (Aesculap® temporary clip). SSEP monitarizasyonu (ESAOYA, Florence, Italy) altında bilateral arteria karotis kommünisin klip ile kapatılması yoluyla iskemik gerçekleştirildi. SSEP kayıtlarında N1-P1dalga çökmesinin izlenmesinden itibaren 10 dakika süreyle iskemik sürdürüldü. Ardından klipler alınarak 0 dak (n=7), 20 dak (n=7), 60 dak (n=7), 240 dak (n=7) reperfüzyon sağlandı. Beyinler 30-40 sn. içinde çıkarılıp sıvı nitrojen içinde donduruldu. Sham grubu (n=7) sıçanlara vertebral arter koterizasyonu ve arteria karotis kommünis klip ile kapatılması dışında tüm cerrahi işlemler uygulandı. SSEP kayıtları bir ön çalışma grubunda (n=10) standardize edildi. Bu sıçanlar 48 saat sonunda paraformaldehid, asetik asit, metanol (1:1:8) karışımının intrakardiyak perfüzyonu ile öldürüldü ve histopatolojik inceleme amacıyla kullanıldı.

Doku Hazırlığı

Beyin dokuları sıvı nitrojenden teker teker alındı. İskemiden farklı derecede etkilenme olasılığı olan ve farklı miktarlarda antioksidan enzim içerebilen bölgelerin homojen bir karışımını elde etmek

amacıyla küçük parçalara ayrılarak iyice karıştırıldı. TBARS düzeylerinin belirlenmesi için, yaş ağırlığı 100 mg olan beyin dokuları, birer ml 150 mM'lık potasyum klorür çözeltisi içinde yarı otomatik homojenizatör (B Braun) ile, 1500 devirde 30 sn. süreyle homojenize edildi. Süpernatant fraksiyon (SF) ve lizozomdan zengin fraksiyon (LZF) enzim aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan doku hazırlığında; yarı otomatik homojenizatör kullanılarak hücre organellerinin mekanik parçalanmasına olanak vermeden yavaş hareketlerle sukroz Tris-HCl tampon (pH 7.4) içinde %10 doku homojenatı hazırlandı. Homojenatlar 1000 g'de 5 dak. +4°C'de santrifüjlendi. Hücre debrisini içeren pelletler atılarak, süpernatantlar bu kez 10.000 g'de 20 dak. santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlar daha sonra katepsin L ve asid fosfataz aktivite tayinleri yapılmak üzere -70°C'ye kaldırıldı. Her örneğin pelletine % 0.5 Triton X 100 içeren soğuk sukroz tampon ilave edildi, 10 sn. vortekslendi ve buz içinde 60 sn. sonike edildi. Daha sonra tüpler buz içinde bir saat bekletildi. Yapılan soğuk ekstraksiyon işlemi ile lizozomal membranların olabildiğince parçalanması ve lizozomal enzimlerin lizozomdan zengin fraksiyon içinde en fazla miktarda serbest halde bulunması amaçlanmıştır. Bu işlemden sonra da lizozomdan zengin fraksiyon katepsin L ve asid fosfataz aktivite tayinleri yapılmak üzere -70°C'ye kaldırıldı. Antoksidan enzim düzeylerinin belirlenmesi için yapılan doku hazırlığında; yaş ağırlığı 250 mg olan beyin dokuları 50mM

potasyum fosfat tampon (pH 7.4) ile yıkandı. Dokuların üzerine 8 kat hacimde aynı tampondan ilave edilerek yarı otomatik homojenizatörde buz içinde 1500 devirde 15 sn. süre ile doku homojenizasyonu yapıldı. Elde edilen homojenatlar ultrasonik homojenizatör ile +4°C'de 30 sn. parçalandıktan sonra sitozolik fraksiyonları elde etmek amacıyla ultrasantrifüj kullanılarak (Centrikon 1180) +4°C'de 100.000g'de 60 dak. santrifüjlendi. Doku protein düzeyi her fraksiyonda ayrı ayrı belirlendi.

TBARS Düzeyinin Belirlenmesi

TBARS düzeyinin belirlenmesinde Uchiama ve Mihara (20) nin spektrofotometrik yönteminden yararlanıldı. Tiyoobarbitürik asid ile reaksiyona giren maddelerin oluşturduğu pembe kromojen n-butonal ile organik faza çekitlendi. Kromojen 535 nm dalga boyunda değerlendirildi. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

Katepsin L Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katepsin L enzim aktivitesi Shuja (21)'nin modifiye Barret (22) yöntemi ile belirlenmiştir. Örnekteki katepsin L enzimi, sentetik bir peptid olan benzoil-fenilalanin-arginin-4-metoksi-2-naftilamid (Z-Phe-Arg-MNA) substratını 37°C'de pH 3.5 de hidrolize eder. Ortaya çıkan amino asid kalıntılarının Fast Blue B (0-dianisidine - tetratotized) ile oluşturduğu pembe rengin şiddeti 520 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Örnekteki katepsin L aktivitesi bulunan absorbans ile doğru orantılıdır. Metilnaftil

amid (MNA) çözeltisinin 20-100 nmol/ml konsantrasyonları standart olarak kullanıldı. Örneklerin aktiviteleri dakikada hidrolize olan nanomol cinsinden substrat (nmol/dk) olarak belirlendi. Doku protein miktarları saptanarak katepsin L spesifik aktiviteleri nmol/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Asid Fosfataz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Asid fosfotaz aktivitesi Hillman (23)'ün spektrofotometrik yöntemi esasına göre DACOS XL otoanalizörü kullanılarak belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Superoksid Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivitesini belirlemek amacıyla ilk kez Beauchamp ve Fridovich (24) tarafından tanımlanan ve Sun (25)'in geliştirdiği indirekt inhibisyon yönteminin modifikasyonu kullanıldı. Yöntemde superoksid akışı elde etmek için ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu kullanıldı. Nitroblue tetrazolium (NBT)'un superoksid radikali O₂ tarafından indirgenerek mavi formazon oluşumu 560 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Örnekteki SOD, indikator NBT ile superoksid radikali arasındaki reaksiyon hızını engellemek için, O₂ ile yarışa girmektedir. Bu engellenmenin yüzdesi aktivitenin miktarı ile doğru orantılıdır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{A(\text{kör}) - A(\text{örnek})}{A(\text{kör})} \times 100$$

A (kör)

Standart olarak sığır karaciğeri Cu-Zn SOD

kullanılan yöntemde sonuçlar U/mg sitozol protein olarak belirlendi.

Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi, Goth (26)'ın hidrojen peroksidin amonyum molibdat ile oluşturduğu stabil kompleksin spektrofotometrik değerlendirilmesine dayanan yöntemi ile ölçüldü. Sığır karaciğer katalazı standart olarak kullanıldı. Sonuçlar U/mg sitozol protein olarak verildi.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

GSH-Px aktivitesi Paglia (27)'nin yöntemi ile belirlendi. Yöntem, redukte glutasyonun (GSH) endojen glutasyon peroksidaz katalizi ile okside glutatona (GSSG) oksidasyonu ve redukte glutatona eksojen glutasyon reduktaz (GR) ile rejenerasyonu esasına dayanmaktadır. Standart olarak sığır karaciğer GSH-Px kullanıldı. Sonuçlar mU/mg sitozol protein olarak belirlendi.

Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Dokudaki protein konsantrasyonlarını belirlemek

amacıyla Lowry (28) yönteminden yararlanıldı. Standart olarak bovine serum albumin (BSA) 10-100 µg/ml konsantrasyonlarda kullanıldı.

İstatistiksel analiz

Gruplar arasındaki farklar ANOVA ile analiz edildi. Ardından anlamlı bulunan farklara Mann Whitney-U testi uygulandı.

BULGULAR

Penumbbral iskemiye izleyen 0 dak, 20 dak, 60 dak, 240 dak. reperfüzyon gruplarının TBARS değerlerinde, sham grubununki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamazken, sadece 60 dak reperfüzyon grubunun TBARS değerleri 0 dak reperfüzyon grubuna oranla yükselmiş olarak bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 1). Benzer şekilde, katepsin L ve asid fosfataz aktivitelerinin supernatan fraksiyonlarının lizozomdan zengin fraksiyona oranı (SF/LZF) açısından, penumbbral iskemiye izleyen tüm reperfüzyon grupları, sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 1).

Tablo 1: Penumbbral iskemide sıçan beyin dokusunda katepsin L (KL) ve asid fosfatazın (AF) süpernatant fraksiyonlarının, lizozomdan zengin fraksiyonlara oranları (SF/LZF) ve tiyobarbitürik asid ile reaksiyona giren maddelerin (TBARS) miktarları.

	SF/LZF (KL)	SF/LZF (AF)	(TBARS) (nmol/mg protein) (Art Ort± S.S)
ISKEMİ	Penumbbral Iskemi	Penumbbral Iskemi	Penumbbral Iskemi
REPERFÜZYON			
0 dak. (n=7)	1.27 ± 0.12	1.32 ± 0.14	0.858 ± 0.122
20 dak. (n=7)	1.38 ± 0.22	1.23 ± 0.11	0.995 ± 0.138
60 dak. (n=7)	1.41 ± 0.19	1.28 ± 0.18	1.153 ± 0.140
240 dak. (n=7)	1.39 ± 0.21	1.05 ± 0.06	0.991 ± 0.097
Sham(n=7)	1.34 ± 0.16	1.13 ± 0.08	0.999 ± 0.146

Antioksidan enzimlerden superoksit dismutaz aktiviteleri, penumbra iskemisinin tüm reperfüzyon gruplarında sham grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0.05$). (Tablo II). Glutasyon peroksidaz aktiviteleri ise penumbra iskemisinin 0 dak. reperfüzyon grubu dışındaki tüm reperfüzyon gruplarında sham grubununki ile karşılaştırıldığında azalmış olarak bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo II). Penumbra iskemisi reperfüzyon grupları katalaz aktiviteleri açısından sham grubu ile karşılaştırıldığında ise, anlamlı düzeylerde yüksek bulundu. ($p < 0.05$) (Tablo II).

SSEP kayıtlarının incelenmesi sonucunda iskemisinin başlangıcı olarak kabul edilen N1-P1 dalga yüksekliklerindeki %50'lik azalma, penumbra iskemide %30'a kadar düştü. N1-P1 dalga yükseklikleri 240 dak. reperfüzyon

uygulanan hayvanlarda yeniden preiskemik değerlerin %90'ına ulaştı. Histopatolojik olarak penumbra iskemisi uygulanan rat beyin kesitlerinin, hemotoksilen eozin boyasının ardından ışık mikroskobu ile yapılan histopatolojik incelemesinde ($\times 40$); iskemiyeye en duyarlı olan hipokampus CA1 bölgesinde normal nöronların yanısıra, bazı nöronlarda büzölmüş sitoplazma ve nükleus, koyu kırmızı boyanan sitoplazma ve kaybolmuş nükleolus şeklinde iskemik değişiklikler gözlemlendi. İskemiyeye daha az duyarlı olan hipokampus CA2 ve CA3 bölgelerinde normal nöronlar arasında çok az sayıda iskemik hücre değişiklikleri içeren nöronlar belirlendi. Deneysel işlem sırasında arteriyel kan basıncı ve vücut ısısı değişmedi.

Tablo II: Penumbra iskemide sıçan beyin dokusunda süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) aktivite düzeyleri

	(SOD) (U/mg protein) (Art.Ort±SS)	(GSH-Px) (mU/mg protein) (Art.Ort±SS)	(KAT) (U/mg protein) (Art.Ort±SS)
İSKEMİ	Penumbra Iskemi	Penumbra Iskemi	Penumbra Iskemi
REPERFÜZYON			
0 dak. (n=7)	3.12 ± 0.38 ^a	95.2 ± 8.8	3.75 ± 0.41 ^a
20 dak. (n=7)	3.42 ± 0.72 ^b	79.6 ± 7.0 ^a	3.81 ± 0.52 ^a
60 dak. (n=7)	2.72 ± 0.68 ^a	79.5 ± 10.03 ^a	3.81 ± 0.36 ^a
240 dak. (n=7)	2.94 ± 0.46 ^a	85.0 ± 10.2 ^b	3.60 ± 0.251 ^a
Sham(n=7)	4.55 ± 0.59	106.9 ± 13.7	2.30 ± 0.31

^a $p < 0.01$ sham grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0.05$ sham grubu ile karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Bu çalışmada penumbral iskemiye izleyen değişik reperfüzyon sürelerinde TBARS değerlerinin sham grubununkine oranla değişmediği gözlemlendi. Sadece 60 dak. reperfüzyon grubu değerleri, 0 dak. reperfüzyon grubu, bir başka deyişle salt iskemi grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmiş bulundu. Benzer ılımlı deneysel sıçan iskemi modellerinde White (29) ve Harokova (30) TBARS değerlerinde iskemi sırasında meydana gelen azalmayı reperfüzyon ile ortaya çıkan bir yüksekliğin izlediğini belirlemişlerdir. Ischi (31), Mrsuljia (32), Krause (33), gerbil beyninde iskemi ile TBARS değerlerinin sabit kalırken, reperfüzyon ile arttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda penumbral iskemi ve izleyen reperfüzyon süreçlerinde supernatan fraksiyonunda bulunan lizozomal enzim aktivitelerinin, lizozomdan zengin fraksiyondaki aktivitelere oranlarının değişmediği belirlenmiştir. Molchanova (11) ve Ichiara (10) sıçan kalbi ve karaciğeri üzerinde yaptıkları çalışmalarda supernatan fraksiyonundaki asid fosfataz ve katepsin D aktivitelerinin iskemi süresi uzadıkça ve reperfüzyon süreci içinde, lizozomdan zengin fraksiyona oranla arttığını belirlemişler, bunun da lizozomal membran hasarının bir göstergesi olduğunu öne sürmüşlerdir.

Organizmada iskemi sırasında hücre düzeyinde solunum ve oksidatif fosforilasyon kenetlenmesinin bozulmasının ardından dokuda enerji potansiyelinin azaldığı bilinmektedir. Daha

sonra, lipidden zengin membranda iyon kanallarının fonksiyon görememesi, enzimatik lipoliz, periferel proteinlerin kaybı ve reseptörlerde değişiklikler ortaya çıkmaktadır (34). Reperfüzyonda ise superoksid radikallerinin aşırı yapımı ile lipid peroksidasyonunun ve TBARS gibi toksik peroksidasyon ürünlerinin birikmesi sonucu hücresel membranlardaki hasarın daha da ilerlemesi söz konusudur (35). İskemi ve reperfüzyonda hücre membranlarında ortaya çıkan bu değişiklikler daha çok iskeminin derinliği ve süresi ile ilişkili olarak, membrandaki iyon kanallarının dolayısıyla hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulduğu geri dönüşümsüz hasar durumunda meydana gelmektedir. Penumbral iskemi değişik yazarlar tarafından spontan ve uyarılmış elektriksel potansiyellerinin olmadığı, ancak membran potansiyellerinin, iyon dengesinin ve enerji metabolizmasının korunduğu, kritik kan akımı olan, tedavi ile kurtarılabılır iskemik bölge olarak tanımlanmaktadır.

Çalışmamızda TBARS değerlerinin ve lizozomal enzim aktivitelerinin SF/LZF (supernatan fraksiyon/lizozomdan zengin fraksiyon) oranlarının penumbral iskemide ve izleyen reperfüzyon sürelerinde genel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemesi, penumbra benzeri iskemi modelimizde hücre membranlarında sadece 60 dak. reperfüzyonda minimal bir lipid peoksidasyonu olduğunu, lizozomal membran bütünlüğünün korunduğunu dolayısıyla lizozomal enzimlerin lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutularak ileri

hücre içi proteolizin engellendiği ortaya koymaktadır.

Beyin iskemisi reperfüzyonu ile sistein proteaz türü katepsinlerin ilişkisini inceleyen çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Nitatori (36) katepsin B, H ve L'nin postiskemik programlı hücre ölümüne katıldıklarını öne sürmüşlerdir. Benzer bir çalışmada katepsin B ve L'nin postiskemik CA1 nöronlarında hücre proteinlerini yıktıkları gösterilmiştir (37). Hara (38), sistein proteaz inhibitörlerinin iskemik nöronal dokudaki fonksiyonel düzelmeyi programlı hücre ölümü ile ilişkili olan enzimlerin blokajı yoluyla sağladıklarını belirtmiştir.

Serebral iskemisi ve reperfüzyon hasarında, çoğu hücre içinden kaynaklanan serbest radikallerin rol oynadığı kabul edilmektedir (39). Bu nedenle birincil antioksidan savunma sistemini oluşturan superoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin iskemisi reperfüzyon hasarına uğramış dokudaki düzeyleri dokunun hasardan etkilenme derecesini belirleyen en önemli parametrelerdir. Ayrıca bu enzimlerin aktivite değişiklikleri oksidatif stress göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda penumbral iskemisi ve reperfüzyon sürecinde SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azalması ılımlı iskemisi olarak kabul edilen penumbral iskemide de serbest radikal oluşumunun gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Çeşitli iskemisi modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde

artma, azalma veya değişmeme şeklinde sonuçlara rastlanmaktadır (13,15,16,40,41). Chan (42) sıçan beyinde uygulanan dekapitasyon iskemisi modelinde, 30 ve 60 dak. iskemisi sonrasında SOD ve GSH-Px aktivitelerinin %37 ve %57 oranlarında arttıklarını göstermiştir. Mrsuljia (32) ve Stanimirovic (40) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda gerbil beyinde 15 dakikalık bilateral a. karotis ligasyonunun ardından SOD aktivitelerinin azaldığını bildirmişlerdir. İmmunohistokimyasal bir çalışmada bir saatlik a. serebri media oklüzyonu ardından iskemik penumbra CuZn-SOD immunoreaktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (43).

Sonuçlardaki bu farklılıklar olasılıkla kullanılan serebral iskemisi modellerinin farklılığından ve biyolojik dokularda antioksidan enzim aktivite ölçümlerinin güçlüğünden kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda Pulsinelli (18) tarafından tanımlanan dört damar oklüzyon modeli SSEP monitorizasyonu ile klinikte birçok ılımlı iskemisi durumun iyi bir örneği olan penumbra benzeri koşulları oluşturmak üzere modifiye edildi. Serebral kan akımı 12ml/100gr/dak. olduğu zaman penumbral iskemisi olarak kabul edildi. Bu durumda SSEP dalga yükseklikleri preiskemik değerlerin %30'una düştü. Ancak 60 ve 240 dak. reperfüzyon ile hemen hemen normal değerlere yaklaştı. Bu çalışmada SSEP monitorizasyonu, standart, tekrarlanabilir bir penumbral iskemisi modeli oluşturmak üzere güvenle kullanıldı. Ayrıca SOD enzim aktivitelerinin belirlenmesi sırasında Sun (25)'in ölçüm yöntemi modifiye edilerek, her

örnek için örnek kör kullanımı ile, dokudan kaynaklanabilecek ve sonuçlarda değişikliğe yol açabilecek spontan oksidasyonun interferansının engellenmesi sağlandı.

İskemi ve reperfüzyon ile SOD, GSH-Px aktivitelerinde ortaya çıkan azalmaya karşın katalaz aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Mirshra (14) domuz beyinde 60 dak'lık hipoksiyi takiben oluşturulan 30 dak'lık normoksida ve sham grubu hayvanlar arasında katalaz aktiviteleri açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır. 200 dak'lık sıçan beyin iskemisini izleyen 10 dak.'lık reperfüzyon çalışmasında ise kontrol ve deney grubu sıçan beyinlerinde hiç katalaz aktivitelerine rastlanmamıştır. Bu durum olasılıkla katalazın çoğunluğunun içinde bulunduğu peroksizomların homojenizasyon işlemi sırasında yeterince parçalanmamasından veya beyindeki düzeyi çok düşük olan katalazın ölçümü için kullanılan yöntemin çok duyarlı olmamasından kaynaklanmaktadır (44).

Stanimirovic (40) beyin iskemii-reperfüzyonundaki antioksidan enzim aktivite stimülasyonunu geçici

substrat induksiyonu şeklinde açıklamaktadır. Bu görüş katalaz ile ilgili sonuçlarımızı kısmen açıklayabilmektedir. Penumbra iskemide hücre içinde oluşan serbest radikaller peroksizomlar içinde korunan katalazın üç boyutlu yapısını etkileyecek kadar yoğun olmamakta ancak sitozolde oluşan ve çoğunluğu GSH-Px tarafından etkisiz hale getirilen hidrojen peroksidin az bir miktarı peroksizomlara sızarak enzim yapısında değişiklik oluşturup, enzimin substrat molekülüne olan ilgisini artırıyor olabilir.

Sonuç olarak; penumbra beyin iskemii-reperfüzyonu sürecinde ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri intraselüler antioksidan enzimler tarafından etkisiz hale getirilirken bu enzimlerin önemli bir kısmı kullanılmakta, böylece hücre plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonu engellenirken membran bütünlüğü korunmaktadır. Bu nedenle polietilen glikole konjuge edilmiş veya lipozom içinde verilen SOD tedavisi penumbra iskemide azalan antioksidan enzimlerin yerine etkili bir replasman tedavisi olarak uygulanabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Garcia JH, Anderson ML. Physiopathology of cerebral ischemia. CRC Critical Reviews in Neurobiology 1989; 4: 303-324.
2. Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. Crit Care Med 1988; 16: 714-726.
3. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Prog-Brain Res 1985; 63: 39-58.
4. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I: Pathophysiology. J Neurosurg 1992; 77: 169-184.

5. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993; 26: 359-370.
6. Suzuki J. Biochemical events in the ischemic brain and pharmacological basis of mannitol, vitamin E, glucocorticoid and phenytoin. In *Advances in surgery of cerebral stroke proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke*. Springer-Verlag Press, Sendai, 1987; 257-263.
7. Yoshida S, Inoh S, Sano T. Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. Lipid peroxidation as a possible cause of postischemic injury. *J Neurosurgery* 1980; 53: 323-331.
8. Agardh CD, Zhang H, Smith ML, Siesjö BK. Free radical production and ischemic brain damage: influence of postischemic oxygen tension. *Int J Devl Neuroscience* 1991; 9: 127-138.
9. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27: 1124-1129.
10. Ichihara K, Haneda T, Onodera S, Abiko Y. Inhibition of ischemia-induced subcellular redistribution of lysosomal enzymes in the perfused rat heart by the calcium entry blocker, diltiazem. *The Pharmacol Exp Ther* 1987; 242:1109-1113.
11. Molchanova LV, Nickulina SE, Ivanova TN, Ivanov AI, Polyskova ED. Role of cAMP in regulation of activity of acid hydrolases of rat heart and liver during ischemia and after recirculation. *Resuscitation* 1991; 22: 261-274.
12. Kalra J, Prasad K. Oxygen free radicals and cardiac depression. *Clinical Biochemistry* 1994; 27: 163-168.
13. Michowiz SD, Melamed E, Pikarsky E, Rappaport ZH. Effect of ischemia induced by middle cerebral artery occlusion on superoxide dismutase activity in rat brain. *Stroke* 1990; 21: 1613-1617.
14. Mishra OP, Papadopoulos M.D, Wagerle LC. Anti-oxidant enzymes in the brain of newborn piglets during ischemia followed by reperfusion. *Neuroscience* 1990; 35: 211-215.
15. Tokuda Y, Uozumi T, Kawasaki T. The superoxide dismutase activities of cerebral tissues, assayed by the chemiluminescence method, in the gerbil focal ischemia/reperfusion and global ischemia models. *Neurochem Int* 1993; 23:107-114.
16. Horakova L, Ondrejickova O, Uraz V, Lukovic L, Juranek I. Short cerebral ischemia and subsequent reperfusion and treatment with stobadine. *Experienta* 1992; 48: 872-874.
17. Ishii H, Stanimirovic DB, Chang CJ, Mrsulja BB, Spatz M. Dopamine metabolism and free radical related mitochondrial injury during transient brain ischemia in gerbils. *Neurochemical Research* 1993; 18: 1193-1201.
18. Pulisinelli WA, Buchan AM. The four vessel occlusion rat model; method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 1988; 19: 913-914.
19. Richards DA, Obrenovitch TP, Mora AJ, İşlekel S, Symon L. and Curzon G. Effect of global ischemia, under simulated penumbral conditions, on brain monoamine neurochemistry and subsequent neurological and histological deficits. *J Neurochem* 1993; 61: 1801-1807.

20. Uchiama M, Mihara M. Determination of malondialdehyd precursor in tissue by tiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1977; 86:271-275.
21. Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991; 49: 341-346.
22. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. *Meth. Enzymol* 1991; 80: 535-561.
23. Hillmann G. Fortlaufende photometrische messung der sauren phosphatase aktivitat. *Clin Chem Klin Biochem* 1971; 9: 273.
24. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1971; 44: 276-287.
25. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34 : 497-500.
26. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinical Chimica Acta* 1991; 196: 143-152.
27. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 1: 158-169.
28. Lowry OH., Rosebrough NJ, Farr AL. and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
29. White BC, Rafols JA, De Gracia DJ, Skjaerlund JM, Krause GS. Florescent histochemical localization of lipid peroxidation during brain reperfusion. *Ann Emerg Med* 1992; 21: 634-641.
30. Horakova L, Ondrejickova O, Uraz V, Lukovic L, Juranek I. Short cerebral ischemia and subsequent reperfusion and treatment with stobadine. *Experienta* 1992; 48: 872-874.
31. Ishii H, Stanimirovic DB, Chang CJ, Mrsulja BB, Spatz M. Dopamine metabolism and free radical releated mitochondriol injury during transient brain ischemia in gerbils. *Neurochemical Research* 1993; 18: 1193-1201.
32. Mrsuljia BB, Stanimirovic D, Micic DV, Spatz M. Excitatory amino acid receptors, oxido-reductive process and brain edema following transient ischemia in gerbils. *Acta Neurochirurgica Suppl* 1990; 51: 180-182.
33. Krause GS, Joyce KM, Nayini RN, Zonia CL, Garritano AM. Cardial arrest and resuscitation: Brain iron delocalization during reperfusion. *Annals of Emergency Medicine* 1985; 14: 1037-1043.
34. Domanska-Janik K, Pylova S. Rapid enhancement of cAMP accumulation in rat brain particulate fraction after ischemia. *Int. J Tiss Reac* 1989; X1:73-79.
35. Imagawa DK, Osifchin NE, Paznekas WA et al. Consequences of cell membrane attack by complement: release of arachidonate and formation of inflammatory derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 6647-6651.
36. Nitatori T, Sato N, Kominami E, et al: Participation of cathepsins B, H and L in perikaryal condensation of CA1 pyramidal neurons undergoing apoptosis after brief ischemia. *Adv Exp Med Biol* 1996; 398:177-185.
37. Kohda Y, Yamashima T, Sakuda K, et al: Dynamic changes of cathepsins B and L expression in the monkey hippocampus after

- transient ischaemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228:616-622.
38. Hara H, Friedlander RM, Garliardini V, et al: Inhibition of interleukin I beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2007-2012
39. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Surg* 1991;161: 488-502
40. Stanimirovic D.B, Micic DV, Markovic M, Spatz M, Mrsulja BB. Therapeutic window for multiple drug treatment of experimental cerebral ischemia in gerbils. *Neurochemical Research* 1994; 19: 189-194.
41. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. Cu, Zn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J* 1981; 199: 393-398.
42. Chan PH, Chu L, Fjshman RA. Reduction of activities of superoxide dismutase but not of glutathione peroxidase in rat brain regions following decapitation ischemia. *Brain Research* 1988; 439: 388-390.
43. Liu XH, Kato H, Araki T, Hoyama Y, Kota K. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase following focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res* 1994; 25: 257-266.
44. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 1989; 126: 23-33.