

AKUT İSKEMİDE HÜCRE ZEDELLENMESİ VE NÖROPROTEKTİF MEKANİZMALARI

Sevinç AKTAN

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji A.D., İstanbul

ÖZET

Yazıda sıra ile iskemi-reperfüzyon zedelenmesinin biyokimyası, iskemik zedelenme : Glutamat ve Ca²⁺, reperfüzyon zedelenmesi, serbest oksijen radikalleri, nöron gelişimi, survival, terminal diferansiyasyon ve apoptosis için gerekli sinyaller, iskemi -reperfüzyon zedelenmesi sonucu nöron ve diğer hücrelerin tamir yetenekleri, nörotrofik faktörler, insulinin protektif etkisi ve sonuçlar son literatür bilgiler ışığında irdelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Iskemi - reperfüzyon , serbest radikal, nörotrofik faktör, insulin, sıçan, apoptosis

CELL DAMAGE AND NEUROPROTECTIVE MECHANISMS IN ACUTE STROKE

In this paper the biochemistry of ischemia-reperfusion injury, ischemic injury: Glutamate and Ca²⁺, reperfusion injury: free oxygen radicals, signals for neuron development, survival, terminal differentiation and apoptosis, the result of ischemia-reperfusion injury ; repairment capabilities of neuron and other cells, neurotrophic factors, the protective effect of insulin and results were discussed.

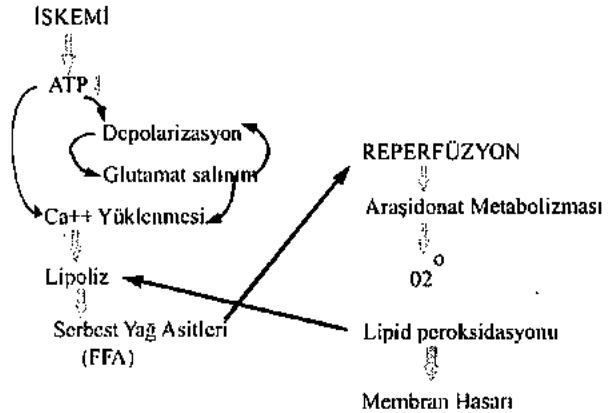
Key Words: Ischemia-reperfusion , free radicals, neurotrophic factor, insulin , rat, apoptosis.

Beyin dokusunu sulayan damarlardan biri tıkanıp zaman , tıkanmanın distalinde Beyin Kan Akımı (BKA) azalır (1). BKA 10ml/100gr beyin dokusu/dk ya indiğinde nöron , glia, kan damarları ve sinir liflerinde nekroza kadar giden yapısal değişiklikler oluşur, beyin dokusu bütünlüğünü kaybeder ve sonuçta infarktüs gelişir. BKA'nın 10-20 ml/100gr beyin dokusu/dk indiği , infarktüs çevresindeki "border-zone" alanda ise beyin dokusunun bütünlüğü korunur , ancak nöral disfonksiyon ve selektif nöron zedelenmesi olabilir. Bu "border-zone" alana aynı zamanda "iskemik penumbra" da denir (19,26). Kan akımının yeniden sağlanmasıyla doku oksijenlenmesi ile birlikte dokuda düzelleme beklenirken , kan ve zedelenmiş doku arasındaki etkileşim sonucu doku zedelenmesi daha da ilerler. Bu kan akımının geri dönüşünün paradoks etkisine "reperfüzyon zedelenmesi" denir(9). Reperfüzyon sonrası nöron ölümünün belirgin hale geldiği ve infarkt alanının genişlediği gösterilmiştir.

Komplet iskemiden yaklaşık 4 dakika sonra , beynin enerjisini sağlayan ATP hızla azalır ve hücre membranındaki iyonların dengesi bozulur. Hücre içine Ca²⁺ iyonları hızla akmaya başlar . Hücre membranı depolarize olur (35). iskeminin uyardığı depolarizasyon sonucu eksitatuar aminoasit nörotransmitterler (EAA) glutamat, aspartat açığa çıkar ve kontrol değerlerinin 8-10 katına ulaşır. EAA'lerin N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörünü uarması sonucunda Ca²⁺ 'un hücre içine girişi daha da artar. Sonuçta hücre içinde Ca²⁺ , kendine özgü kalmodulin adlı proteazı uyararak fosfolipaz A₂'yi aktive eder. Lipolitik etki sonucu ; serbest yağ asitleri , özellikle

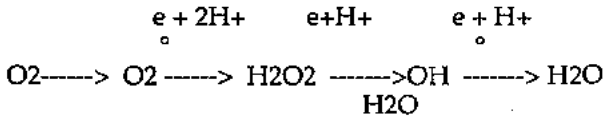
BKA : Beyin kan akımı
EAA : Eksitatör amino asit
AA : Arakidonik asit
IGF : İnsülin - like growth factor
BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

de Arakidonik Asit (AA) ortaya çıkar(şekil 1) (15,37).



Şekil 1: İskemi/reperfüzyon zedelenmesinin biyokimyası.

İskemi sonrası görülen doku zedelenmesi özellikle reperfüzyon sırasında ortama eklenen oksijen ve ortaya çıkan serbest radikallerle ilişkilidir. Oksijenin en dış iki yörüngesinde birer elektronu vardır ve indirgenme sırasında serbest radikaller süperoksit (O₂[°]) hidroksil (OH[°]) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşur (şekil 2)(12).

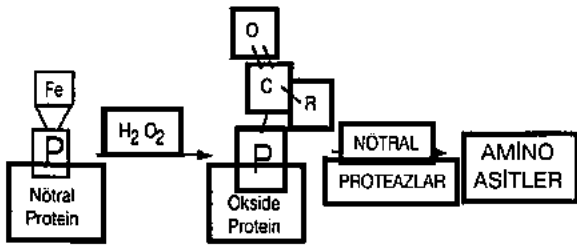


H₂O₂ = hidrojen peroksit
 OH= hidroksil radikali
 O₂= süperoksit

Şekil 2: Oksijenin indirgenmesi ile ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri.

Serbest radikaller en dış yörüngelerinde tek elektron taşıdıklarından bağlanmaya çok açıktırlar ve hemen reaksiyona girerek proteinleri, nükleik asitleri, lipidleri ve karbonhidratları yıkarlar. Özellikle AA yolu, bilinen en önemli serbest radikal kaynağıdır (13). Serbest radikaller özellikle membrandaki doymamış serbest yağ asitlerini atake ederek lipid peroksidasyonuna ve membran hasarına neden olurlar (6). Serbest yağ asitlerinin; hidroperoksit, malonildialdehit gibi yıkım ürünleri ayrıca hücrel ödeme; damar geçirgenliğinde artışa, iltihabi reaksiyonlara ve kemotaksise neden olurlar(6).

İskemi-reperfüzyon zedelenmesinde serbest oksijen radikallerinin zararlı etkisine karşı çok duyarlı olan diğer bir molekül grubu da sülfür içeren proteinlerdir (şekil 3)(25). Serbest oksijen radikali tarafından okside olan proteinler nötral proteazlar ile amino asitlere bölünür. Bunların sonucunda birçok proteinin enzimatik aktivasyonu bozular. Sonuçta serbest oksijen radikalleri dokunun ölümüne neden olur (10).



Şekil 3: Protein oksidasyonu

İskemi -perfüzyon zedelenmesinin önlenmesi için şimdiye kadar kalsiyum kanal antagonistleri, glutaminerjik antagonistler ve serbest oksijen radikallerini ortamdan temizleyen antioksidanlar kullanılmıştır. Ancak bunların tümünün etkileri kısıtlı kalmıştır, yararlı olmadıkları hatta kalsiyum kanal blokörlerinin kardiyak debiyi azaltarak infarkt alanına daha da fazla zarar verebilecekleri gösterilmiştir(6,7).

Son zamanlarda çalışmalar hücrelerin

yenilenme mekanizmalarını hızlandıran faktörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu faktörler içinde, membran tamirini hızlandıran, "transkripsiyon" mekanizmalarını uyaran, nörona özgü enzim yapımını hızlandıran, lipid sentezini arttıran, hücre içi protein yapımını indükleyen, sinir büyüme faktörü; fibroblast büyüme faktörü, insulin, insulin benzeri büyüme faktörü sayılabilir (14,16,31). Bu faktörlerin nöron gelişimi, farklılaşması ve rejenerasyonu yönündeki mekanizmaları tam açık değildir. Ancak santral sinir sisteminin gelişim basamakları incelendiğinde; mekanizmaları daha iyi anlaşılabilir.

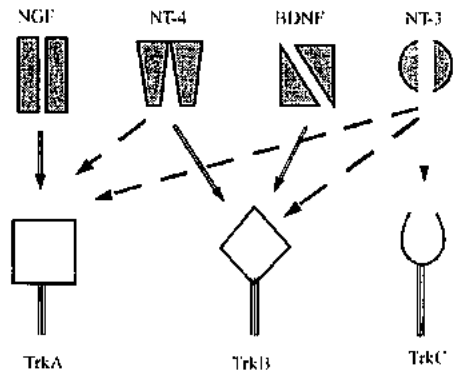
Santral sinir sisteminin gelişimi genellikle 4 başlık altında tartışılır(29):

1. Nöroepitelial uyarılma.
2. Rejyonalizasyon ve şekillenme.
3. Nöron prekürsörlerinin diferansiyasyonu.
4. Survival ve terminal diferansiyasyonu.

Terminal diferansiyasyon ve survival için gerekli faktörler ve bunlara özgü reseptörler, doku kültürü modellerinde çalışılmıştır. Bu faktörler arasında en önemlileri; sinir büyüme faktörü; Beyin Kaynaklı Nörotrofik faktör (BDNF), Nörotrofin 3 ve Nörotrofin 4/5'dir. Nörotrofinler için iki ayrı grup reseptör tanımlanmıştır:

1. Yüksek affiniteli Trk ailesinden "tyrosin kinaz" reseptörleri
2. Düşük affiniteli "P 75" reseptörü.

Trk reseptörleri herbir nörotrofin için özellik gösterirken; P75 reseptörü hepsini bağlayabilir (şekil4)(28).



Şekil 4: Nörotrofik faktörler ve tirozin kinaz reseptörleri.

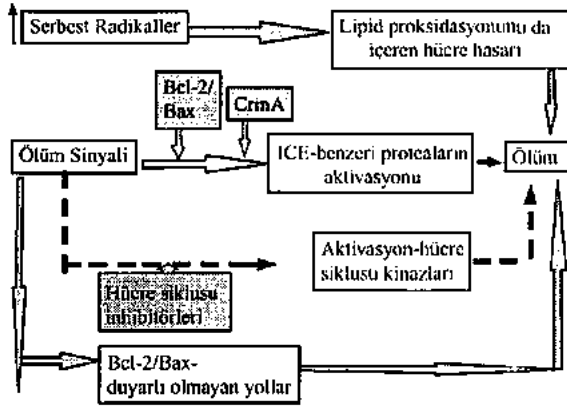
NGF: Nerve Growth Factor
 NT/3-4: Nörotrofik Faktör
 BDNF: Brain Derived Nörotrofik Faktör, Trk A,B,C: Tirozin kinaz reseptör

SSS'nin gelişimi sırasında hücreler biryandan yaşamlarını sürdürmek çabası içindeyken, bir yandan da fizyolojik koşullarda ölürler (22). Bir grup hücre hemen bölündükten sonra ölebilir;

diğerleri "target" hücreden salınan trofik faktör için bir yarışmaya girerek yaşamlarını kaybeder. Bir başka grup ise presinaptik yeterli input almadıkları için ölür. Nöronal hücreler ayrıca yaşlanmada, dejeneratif hastalıklarda, nöbet, trauma gibi akut gelişen olaylarda; trofik desteği kaybettikleri için sitoplazma ve nükleusta oluşan bir seri reaksiyon sonucu yaşamlarını kaybederler (24).

Bir trofik faktör deprivasyonu sonucu, hücre ölüm sinyali alır (şekil 5). Bir dizi hücre reaksiyonu sonucu apoptozis (hücre ölümü) gerçekleşir. Bu program dahilindeki ölümü gerçekleştiren en önemli faktör hücre içinde serbest radikallerin artması ve lipid peroksidasyonu ile hücre membranının zarar görmesidir. Diğer bir yol, hücre içi sistein proteaz interlökin 1- β converting enzim (ICE) aktivasyonudur. Diğer bir yolda hücre siklusunu sağlayan kinazların aktivasyonudur (18,38).

Hastalık, transplantasyon ve rejenerasyon



Şekil 5: Nöronların fizyolojik ölüm programları.

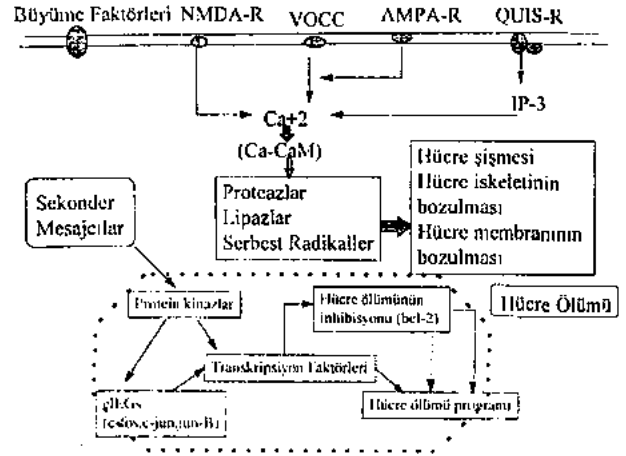
Son zamanlarda tanımlanan proto-onkogen olan Bcl-2, sitoplazmadaki Bax proteini ile birleşerek, gerek antioksidan etkisi gerekse proteaz ve kinazları inaktive ederek hücreyi apoptozdan korur (11,20).

İskemi/reperfüzyon sonrası oluşan hücre ölümünde, growth faktörleri; nükleus içinde protein kinazları aktive ederek, erken oluşan proto-onkogenlerden c-fos ve c-jun'u aktive ederek, Bcl-2'nin transkripsiyonunu uyararak hücreyi olası bir ölümden koruyabilirler (şekil 6)(34).

Nörotrofik faktörlerden IGF; sıçanlarda iskemiden hemen sonra lateral ventriküle enjekte edilmiş, apoptozisi engellediği ve infarkt alanını küçülttüğü gösterilmiştir (6).

Sinir Büyüme Faktörü veya BDNF sıçanlarda, transient önbeyin iskemisinden sonra

intraventricüler olarak uygulanmış ve CA1 piramidal hücrelerde nekrozu azalttığı gösterilmiştir (23,3).



Şekil 6: İskemi/reperfüzyon zedelenmesinde, nöron ölümünü uyaran ve inhibe eden mekanizmalar:

1-) Hücre içi aratan kalsiyum ölüm mekanizmalarını indükliyor.

2-) Nörotrofik faktör: Nükleustan antiapoptotik bir gen olan Bcl-2'nin transkripsiyonunu uyarıyor.

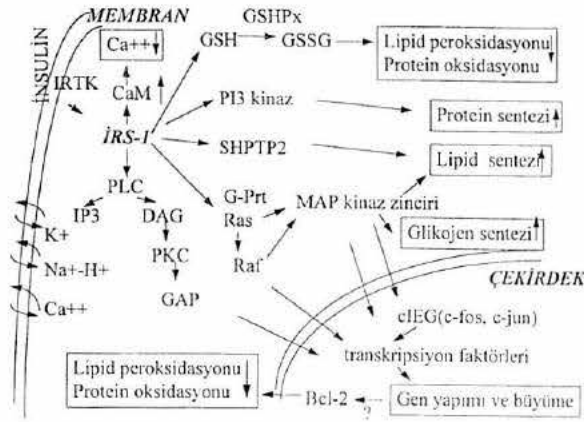
Bu koruyucu etkilerini ya hücre içi Ca²⁺ dengesini sağlayarak ya da Bcl-2 genini transkripsiyonunu uyararak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (4).

Endojen nöroprotektif maddelerden biri de insulindir. İnsulinin sıçanda iskemide öncesi ya da sonrası kullanımı serebral korteks; talamus ve substansia nigrada infarkt alanını sınırlamıştır (32,33).

İnsulinin iskemide / reperfüzyon zedelenmesindeki koruyucu etkisi salt glukoz kullanımının düzenlenmesi ile sınırlı olmayıp; erken salınımlı protonkojenlerden c-fos ve c-jun'un transkripsiyonunu sağlar. Nükleustan mRNA yapımını artırarak; lipogenesis ve protein sentezi için gerekli olan enzimleri uyarır. Mitokondrideki piruvat dehidrojenaz kompleksini aktive ederek, ATP yapımını hızlandırır. Isı şoku proteinlerini indükler (5,27).

İnsulinin aktivasyonu membrandaki reseptör tirozin kinaza bağlanmasıyla başlar (şekil 7). İnsulin reseptör substrat I (IRS-1) 'in aktivasyonu ile kalmodulini (CAM) fosforile ederek; kalsiyumun fosfolipaz A2 (PLA2) üzerinden lipolizis etkisini suprese eder. Sitoplazmada bulunan Ras ve Raf proteinleri aracılığı ile mitojen aktivated protein (MAP) kinazı aktive ederek glikojen, lipid ve protein sentezlerini uyarır. Glutasyon düzeyini artırarak lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engeller. Nükleus üzerine etki ederek, transkripsiyon faktörlerini uyararak, apoptozis

engelleyen Bcl-2' genini oluşturur. Sonuçta hem hücrenin membranı , hem de sitoplazması ve nükleusu üzerindeki olumlu etkileriyle hücrelerin rejenerasyonunu sağlar (21,30,36).



Şekil 7: Bir endojen nöroprotektif madde olan insulinin etki mekanizması.

IRTKX Insulin reseptör tirozin kinaz.
IRST: Insulin reseptör substrat-1
MAP kinaz: Mitojen aktivatad protein kinaz.
CIEG: Erken oluşan genler.
BCL-2: Antiapoptotik gen.

Marmara Üniversitesi , Tıp Fakültesi Nöroloji ve Fizyoloji Anabilim Dallarının oluşturduğu , sıçanda iskemi/reperfüzyon zedelenmesi modelinde İNSULİN'in lipid peroksidasyonu ; glutatyon ve protein oksidasyonu düzeylerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışma gruplarımız : A. iskemi/reperfüzyon grubu: 10 dakika iskemi sonrasında 8,60,90 dakikalık ve 3 günlük (n=8) reperfüzyon uygulanmıştır.

B. I/R + insulin grubu : 10 dakika iskemi sonrası her grup için ayrı (n=8) 2ü/kg insulin verilmiştir.

C. Sham grubu: Her grup için ayrı (n=8) uygulanmıştır.

Kan glukoz değerleri her grupta 150-200 mg/dl tutulmuştur. Lipid peroksidasyonu (nmol MDA/g doku) değişik reperfüzyon gruplarında ve insulin ile anlamlılık göstermemiştir (şekil 8). Protein karbonil miktarı (nmol/mg protein) reperfüzyon gruplarında anlamlı olarak yükselmiştir (p<0.001,p<0.001). Insulin verilen grupta anlamlı olarak düşmüştür (p<0.01, p<0.01)(şekil 9).

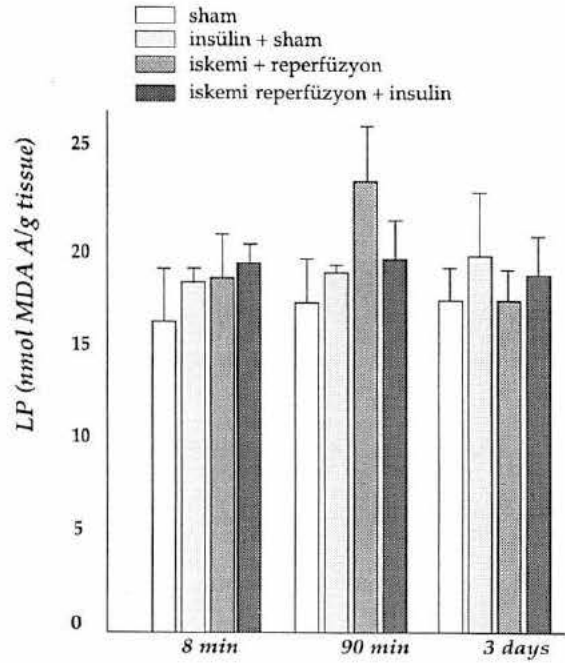
Üç günlük değerler :Protein karbonil miktarı (nmol/mg protein) 3. günde kontrol değerlere ulaşmıştır (p<0.001)

Glutatyon (GSH) (mmol /g doku) reperfüzyonun 8. dakikasında anlamlı olarak düşme kaydederken (p<0.01), insulin verildikten sonra anlamlı olarak yüksek kalmıştır (p<0.001) (şekil 10).

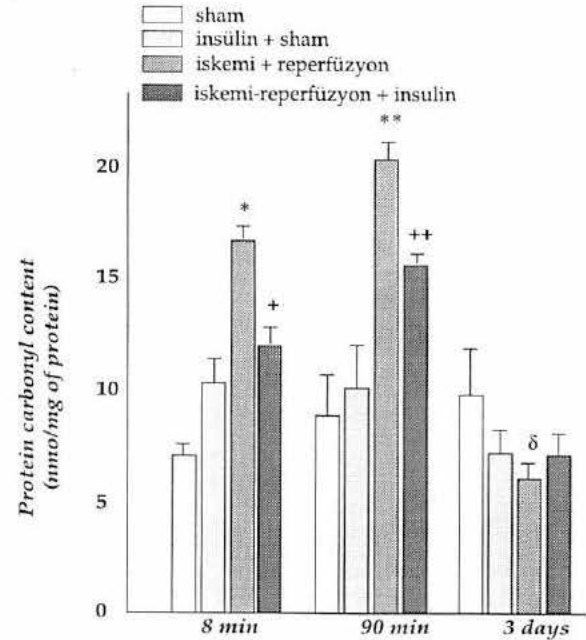
Glutatyon değerlerinin ; reperfüzyonun en erken evresinde (8 dakika) insulin tarafından

Beyin Damar Hastalıkları Dergisi 1996, 2-2:105-110

yüksek düzeylere ulaştırılması ; serbest oksijen radikallerinin , glutatyon peroksidaz reaksiyonu sonucu ortamdan temizlenmesine neden olur.



Şekil 8: Lipid peroksidasyonu: Anlamlı bir farklılık gösterilmedi.

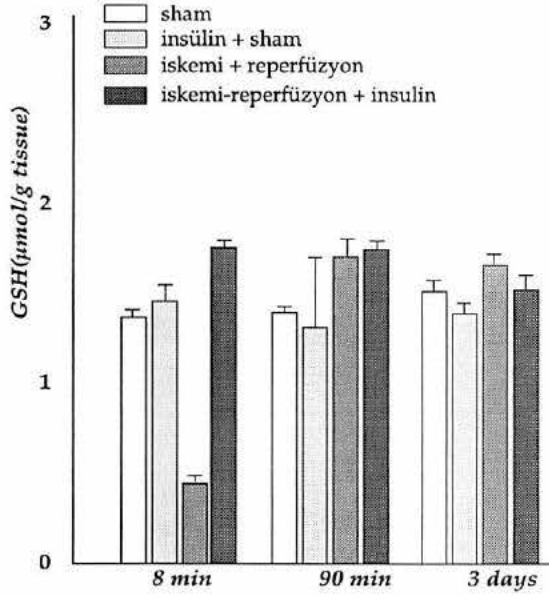


Şekil 9: Protein karbonil miktarları; reperfüzyonun 8. ve 90. dakikalarında sham değerlerine göre anlamlı olarak yükseklik gösterdi (P<0.001, p<0.001).

Üç günlük reperfüzyon döneminde; sham değerlerine kadar düştü. Insulin ile anlamlı (p<0.01, p<0.01) düşme kaydedildi.

Şimdiye kadar insulinin nöroprotektif etkisi olarak anti-oksidan özelliklerinden söz

edilmezken çalışmamız insulinin erken iskemide reperfüzyon zedelenmesinde glutatyon miktarını arttırarak ve protein oksidasyonuna engel olarak , serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini azalttığını göstermiştir.



Sonuç olarak ; akut iskemide ve reperfüzyon zedelenmesinde nörotrofik faktörler umut verici tıbbi stratejileri oluşturmaktadır. Apoptosisi engellerken sentral sinir sistemindeki rejenerasyonu da uyarmaktadır. Trofik faktörlerle yapılan çalışmalar halen sürmekte , hangi yolla verilmesi gerektiği ve sonuçta hasta beyin bölgesine ne denli ulaştığı henüz tam açıklık kazanmamıştır. Uzun süre kullanımları toksik olabileceği gibi diğer nöral sistemlerde aberan büyümeye yol açabilmektedir(2,8,17).

KAYNAKLAR:

1. Aktan S. İskemik beyin zedelenmesinde rol alan etkenler : Beyin dokusu bu zararlı etkilerden korunabilir mi? Klinik Gelişim 1991; 4(12): 1560-1569.
2. Barinaga M. Neurotrophic factors enter the Clinic. Science 1994; 264:772-776.
3. Beck T., Lindholm P., Wree A. Brain -derived neurotrophic factor protect against ischemic cell damage in rat hippocampus. J Cereb Blood Flow Metab 1994;14:689-696.
4. Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. Brain Res 1994;56:640-645.
5. Farese RV, Konda TS, Davis TS. Insulin rapidly increases diacylglycerol by activating de novo phosphatidic acid synthesis. Science 1987;236:586-600.
6. Gluckman PP, Guan EJ, Kempt ND. The role of the insulin-like growth factor system in neural rescue. Annals New York Academy of Sciences 1995;692:138-142.
7. Gluckman PP, Williams CE. Is the care worse than the disease? Caveats in the move from laboratory to clinic. Dev Med 1992;34:1015-1120.
8. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity dependency survival of cortical neurons. Science 1994;263:1618-1622.
9. Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current

- concepts of reperfusion injury. Arch Neurol 1990;47:1245-1252.
10. Halliwell B. Oxidants and human disease: Some new concepts. FASEB J 1987;1:358-363.
11. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin YM. BCL-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 1993;75:241-245.
12. Ikeda Y, Zong DM. The molecular basis of brain injury and brain edema : The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990;27(1): 1-5.
13. Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. Neuroscience 1990;35(3):551-556.
14. Koh S, Oyster GA, Higgins GA. Localisation of nerve growth factor receptor messenger RNA and protein in the adult rat brain. Exp Neurol 1989;106:209-214.
15. Krause GS, White BC, Aust SO. Brain cell death following ischemia and reperfusion : a proposed biochemical sequence. Crit Care Med 1988;16:714-718.
16. Marks JL, Porte D Jr., Baskin DG. Localisation of type I insulin like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by in situ hybridization. Mol Endocrinol 1991;5:1158-1162.
17. Masu y, Wolf E, Holtman B. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. Nature 1993;365:27-31.
18. Mivra M, Zhu H, Rotella R. Induction of apoptosis in fibroblast by IL-1 beta converting enzyme a mammalian homolog of the C. elegans cell Death gene ced-3. Cell 1993;75:241-247.
19. Nedergaard M. Mechanism of brain damage in focal cerebral ischemia. Acta Neurol Scand 1988;77:81-89.
20. Oltvai ZN, Millman MJ, Bischoff JR. BCL-2 associates with the Ras related protein R-Ras P23. Nature 1993;366:274-278.
21. Pillion DJ, Kim SJ, Kim H. Insulin signal transduction: The role of protein phosphorylation. Am J Med 1992;303:40-45.
22. Pittman NR, Mills JC, Wang S. Neuronal cell death : Searching for the smoking gun. Current Opinion in Neurobiology 1994;4:717-720.
23. Rosen DR, Siddique T, Patterson D. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993;362:59-65.
24. Rubin LL, Gatchalian CL, Rimon G. The molecular mechanisms of neuronal apoptosis. Current Opinion in neurobiology 1994;4:696-706.
25. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke 1990;21(7):1086-1090.
26. Siesjö BK. Mechanisms of ischemic brain damage. Crit Care Med 1988;16:954-962.
27. Standaert ML, Pollet RJ. Insulin glycerolipid mediators and gene expression. FASEB J 1988;2:2453-2460.
28. Telsma NT, Aguayo AJ. Trophic factors Current Opinion in Neurobiology 1994;4:717-722.
29. Toyner LA, Guillemot F. Gene targeting and development of the nervous system. Current opinion in neurobiology 1994;4:37-41.
30. Ting LP, Tu CL, Chov CK. Insulin induced expression of human heatshock protein hsp-70. Biol Chem 1989;264:3404-3410.
31. Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. Neuroscience 1991;44:613-619.
32. Voll CL, Auer RN. Post ischemic seizures and necrotizing brain damage ; neuroprotective affect of post ischemic diazepam and insulin. Neurology 1991;41:423-429.
33. Voll CL, Auer RN. Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. J Cereb Blood Flow Metab 1991;11:1006-1010.
34. Vendrell M, Curran T, Morgan JI. Glutamate , immediate early genes, cell death in the nervous system. Annals New York Academy of Sciences 1993;679:132-138.
35. White BC, Krause GS, O'neil BT. Potential role of growth factors in global brain ischemia and reperfusion. Annals New York Academy of Sciences 1983;692:281-289.
36. Yarden Y. Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu Rev Biochem 1988;57:443-451.

Sevinç Aktan

37.Yoshida H., Inoh S, Asono T. Effect of transient ischemia on free fatty acids and phospholipids in the gerbil brain. J Neurosurg 1980;53:323-328.

38.Yucen J., Shaham S, Ledoux S. The c.elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin 1 beta-converting enzyme . Cell 1993;75:641-649.