

## POST-İSKEMİK BEYİN HARABİYETİNİN AZALTILMASINDA ALLOPURİNOL'ÜN ETKİNLİĞİ

Nebahat TAŞDEMİR, Abdurrahman ŞERMET, Basra DENİZ,  
Mehmet GÜLERSÖNMEZ, Cemil TÜMER

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ve Fizyoloji AD.'ları, Diyarbakır

### ÖZET

Geçici ön beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol'ün nöron harabiyetinin azaltılmasındaki etkinliği araştırıldı. Erkek Sprague-Dawley sıçanlara karotid arter oklüzyonundan 48, 24 ve 1 saat önce allopurinol (50 mg/kg) uygulandı. Bir saatlik sol karotid arter oklüzyonundan 24 saat sonra hayvan feda edildi. Beyinleri hızlı bir şekilde çıkartıldı ve serebral ödem miktarı, infarkt hacmi, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak MDA düzeyi, süperoksit dismütaz (SOD) ve Katalaz aktiviteleri belirlendi. Allopurinol uygulanan sıçanlarda post-iskemik serebral ödem miktarı kontrol sıçanlara göre önemli ölçüde azaldı ( $p<0.001$ ). Serebral ödem miktarındaki azalmaya infarkt hacmi ve lipid peroksidasyonundaki önemli azalmalar ( $p<0.001$ ) eşlik etti ve aralarında önemli korelasyonlar bulundu. SOD ve katalaz aktiviteleri ile infarkt hacmi arasında ters ilişkiler saptandı. Allopurinol uygulanan sıçanlarda post-iskemik SOD ve Katalaz aktiviteleri kontrol sıçanlara göre önemli ölçüde yüksek ( $p<0.001$ ) bulundu. Bu bulgular sıçanlarda allopurinol'ün post-iskemik beyin harabiyetini azaltmada etkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Serebral iske mi, lipid peroksidasyonu, süperoksit dismütaz, Katalaz, allopurinol

### EFFECT OF ALLOPURINOL IN DECREASING POST ISCHEMIC CEREBRAL DAMAGE

The effectiveness of allopurinol which is a xanthine oxidase inhibitor, for decreasing neuron damage of rats which temporary precerebral ischemie had been constituted, has been investigated. 48, 24 and 1 hour before carotid arter occlusion, male Sprague-Dawley rats have been administered allopurinol (50 mg/kg). After one hour, rats have been sacrificed, after left carotid occlusion. Their brains have been removed very quickly and the quantity of cerebral oedema, the volume of infarct, MDA level as the indicator of lipid peroxidation, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities have been determined. The quantity of post ischemic oedema of the rats to which allopurinol was applied has been decreased significantly, compared with that of the rats under control ( $p<0.001$ ). Important decreases ( $p<0.001$ ) in infarct volume and lipid peroxidation have accompanied to the decrease in cerebral oedema, and important correlations have been found. Reverse relations have been found between SOD, catalase activities and infarct volume. Post ischemic SOD and catalase activities in rats to which allopurinol was applied have been found significantly high ( $p<0.001$ ), compared with that of rats under control. These findings indicate that allopurinol has effect in decreasing the post ischemic cerebral damage.

**Key words:** Cerebral ischemie, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, allopurinol.

### GİRİŞ

Serbest radikallerin iske mi-reperfüzyon hasarında önemli mediatörler olduğu çeşitli organlarda deneysel olarak gösterilmiştir (1-4). Reaktivitesi yüksek olan bu bileşikler, hücrelerin birçok komponentini doğrudan bozabilme yeteneğindedir (5). Hücreleri serbest radikallerin neden olduğu harabiyete karşı koruyan enzimatik ve nonenzimatik savunma sistemleri vardır (5,6). Eğer bu savunma sistemlerinin kapasitesini aşacak ölçüde serbest radikaller oluşursa hücrelerde patolojik değişiklikler olabilir (7).

İskemik dokularda serbest oksijen radikallerinin bol miktarda üretildiği kabul edilmiştir (8,9). İskemide; ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, mitokondrial enzimler ve aktive olmuş nötrofiller gibi serbest radikal oluşturan birçok potansiyel kaynak bulunmaktadır (10,11). Aşında bunlardan bazıları normal koşullarda bile küçük miktarlarda toksik oksijen radikalleri üretir. Ancak iske mi durumunda serbest radikal oluşumu önemli ölçüde artmaktadır (12).

MDA : Malon Dialdehyde  
SOD : Süperoksit Dismütaz  
TTC : Triphenyltetrazolium Chloride

Mc Cord ve arkadaşlarına göre iske mi repfüzyon durumlarında serbest radikal üreten başlıca enzim ksantin oksidazdır (1). Bu enzimin bir inhibitörü olan allopurinol birçok organ post-iskemik hasarını azaltmak amacıyla denenmiş ve olumlu neticeler alınmıştır (13,14). Serebral iskemideki etkinliği konusunda araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmada allopurinolün post-iskemik beyin harabiyetinin azaltılmasındaki etkinliği araştırılırken serebral ödem, infarkt hacmi, lipid peroksidasyonu, SOD ve Katalaz aktiviteleri arasında korelasyonların bulunup bulunmadığı incelendi.

### GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada vücut ağırlıkları 180-200 g. arasında değişen erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta ve sıcaklığı  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  olan ortamda

normal laboratuvar yemi ile beslendiler. Deney grubu sıçanlara 50 mg/kg allopurinol intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Allopurinol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) serum fizyolojik içinde çözüldü. Çözünürlüğü arttırmak için serum fizyolojik içine sodyum hidroksit (1 M, pH10) katıldı. İlk allopurinol uygulaması karotid arter oklüzyonundan 48 saat, ikinci uygulama 24 saat ve üçüncü uygulama 1 saat önce yapıldı. Hayvanlar periton içine 100 mg/kg ketamin enjekte edilerek uyutuldu. Boyun bölgesinde yaklaşık 2 cm'lik ventral orta hat insizyonu ile sol arteria karotis communis izole edildi ve 5x1 mm atravmatik damar klemp ile kapatıldı. Bir saat sonra klemp çıkartıldı ve insizyon yeri 4x0 ipek ipliklerle dikildi. Serebral iskemisi sırasında vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçüldü ve ısıtıcı bir lamba ile 37±1°C de olması sağlandı. Ayrıca, arteriyel kan basıncı sağ femoral artere yerleştirilen uygun bir kateter aracılığı ile monitörden kaydedildi. A. karotis communis oklüzyonundan 24 saat sonra hayvanlar ketamin anestezisi altında kardiyak ponksiyonla feda edildiler.

Hayvanlardan çıkartılan beyinler bekletilmeksizin sağ (kontrol) ve sol (infarkt) hemisferlerine ayrıldı ve yaş ağırlıkları belirlendikten sonra 60°C de 48 saat süreyle kurutuldu. Beyin hemisferlerinin kuru ağırlıkları da belirlendikten sonra kuru ağırlığın yaş ağırlığa yüzde oranı (p) aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı:

(Kuru ağırlık/Yaş ağırlık) x100 = p. Bulunan değer beyin ödeminin yüzdesini hesaplamada kullanıldı: (Psağ-Psol)/Psolx100 = Beyin ödeminin yüzdesi.

Makroskopik olarak infarkt hacminin ölçümü için in vitro TTC boyama yöntemi (15) kullanıldı: Hayvanlardan çıkartılan beyinlerin bir kısmı buzdolabında soğutulduktan sonra 2 mm kalınlığında enine kesitler alındı. Kesitler, %1 triphenyltetrazolium chloride ve 25 mM potasyum fosfat (PH:7.4) içeren çözeltinin içerisine bırakıldıktan sonra 37°C de 15 dakika bekletildi. Bu boyama işleminden sonra her bir kesitin her iki yüzeyinden fotoğrafları çekildi. Kesitlerde boya almayan bölgelerin (infarkt alanı) yüzölçümleri belirlenmek için fotoğraflar 10 kez büyütülerek milimetrik kağıda projekte edildi. Infarkt hacmini hesaplamak için infarkt alanın yüzölçümü kesit kalınlığı ile çarpıldı.

SOD ve Katalaz aktivitelerinin ölçümü için serebellumu uzaklaştırılan beyinler 25 mM PH: 7.4 sodyum fosfat tamponu (%1 triton- x 100 ve 0.1 mM EDTA ilaveli) ile 10 kez sulandırıldı. (100 mg doku için 10 ml tampon). Teflon homojenizer ile 3000 rpm'de 30 sn'de homojenize edildi. Elde edilen beyin homojenatlarında Murklund yöntemine göre (16) SOD aktivitesi, Aebi

yöntemine göre (17) katalaz aktivitesi ölçüldü. Beyin MDA düzeyleri Uchiyama ve Mihara'nın yöntemi (18) kullanılarak belirlendi.

Elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde gösterildi ve istatistiksel değerlendirmeler için "Student t testi" kullanıldı. Ayrıca, beyin ödemi, infarkt hacmi, MDA düzeyleri, SOD ve Katalaz aktiviteleri arasında ilişkileri belirlemek amacıyla korelasyon testleri uygulandı.

## BULGULAR

Serebral iskemisi ve bir saatlik reperfüzyon sırasında allopurinol uygulanan sıçanlarla kontrol grubu sıçanların ortalama arteriyel kan basınçları ve vücut sıcaklıkları arasında önemli bir farklılık bulunmadı (Tablo 1).

Tablo 1: Unilateral ön beyin iskemisi ve reperfüzyonu sırasında ortalama arteriyel kan basıncı ve vücut sıcaklıkları

	Arteriyel Kan Basıncı (mmHg)		Rektal Sıcaklık (°C)	
	İskemi (5. dak)	İskemi (1. saat)	Reperfüzyon (5. dak)	İskemi (5. dak)
Kontrol (n=7)	118±12	125±13	121±10	37.6±0.4
Allopurinol (n=7)	123±13	128±11	122±9	38.0±0.5

- Sonuçlar ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir.

- Rektal sıcaklık iskemisi ve reperfüzyon sırasında her 10 dakikada bir ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır.

Post-iskemik serebral ödem miktarı kontrol grubu sıçanlarda %21.8 ± 4.2, allopurinol uygulanan sıçanlarda %8.1 ± 0.4 olarak belirlendi. Allopurinol serebral ödem miktarını önemli ölçüde azalttı (p<0.001).

Total infarkt hacmi (hemisfer hacminin yüzdesi) kontrol grubu sıçanlarda %35.2±3.6, allopurinol uygulanan sıçanlarda %18.7±2.1 olarak ölçüldü. Allopurinol post-iskemik serebral infarkt hacminde önemli azalma sağladı (p<0.001).

Tablo 2: Sıçanlarda allopurinol uygulamasının Post-iskemik serebral ödem ve infarkt hacmine etkisi

Hacmi	Beyin Ödemi	Serebral Total Infarkt
	(%)	(%)
Kontrol (n=7)	21.8±4.2	35.2±3.6
Allopurinol (n=7)	8.1±0.4***	18.7±2.1***

- Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

- \*\*\* : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P<0.001

Bu çalışmada lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA (malondialdehit) miktarları esas alındı. Kontrol grubunda  $430 \pm 28$  nMol/gdoku olan post-iskemik beyin MDA düzeyi allopurinol uygulanan grupta  $100 \pm 13$  nMol/gdoku düzeyine indi ( $p < 0.001$ ). Allopurinol post-iskemik beyin MDA düzeyini %76 oranında azalttı. Post-iskemik beyin SOD aktivitesi %18 ve katalaz aktivitesi %20 oranında azaldı. Allopurinol SOD aktivitesindeki azalmayı %75 ve katalaz aktivitesindeki azalmayı %80 oranında önledi (Tablo 3).

Tablo 3: Post-iskemik serebral MDA, SOD ve katalaz düzeylerine allopurinol'ün etkisi.

	MDA (nMol/g.doku)	SOD (Ünite/mg Protein)	Katalaz (Ünite/mg Protein)
Kontrol (Post-iskemik)	$430 \pm 28$	$1.8 \pm 0.03$	$1.2 \pm 0.02$
Allopurinol	$100 \pm 13$	$2.1 \pm 0.04^{***}$	$1.4 \pm 0.02^{***}$
Kontrol (Pre-iskemik)	$25 \pm 5$	$2.2 \pm 0.05$	$1.5 \pm 0.04$

\*\*\*: Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında  $p < 0.001$

SOD ve katalaz aktiviteleri; beyin ödemi, infarkt hacmi ve MDA düzeyleri ile negatif korelasyonlar gösterdi (Tablo 4).

Tablo 4: Serebral ödem, infarkt hacmi, MDA, SOD ve katalaz değerleri arasındaki korelasyonlar

	T değeri (Korelasyon Katsayısı)	T değeri	P değeri
Serebral Ödem $p < 0.001$	Infarkt hacmi	0.812	4.833
$p < 0.05$	MDA	0.624	2.836
$p < 0.05$	SOD	-0.610	2.711
	Katalaz	-0.580	2.468
Infarkt Hacmi $p < 0.01$	MDA	0.715	3.557
$p < 0.05$	SOD	-0.545	2.252
$p < 0.05$	Katalaz	-0.530	2.172
MDA $p < 0.01$	SOD	-0.661	3.060
$p < 0.05$	Katalaz	-0.535	2.201

## TARTIŞMA

İskemik dokuların reperfüzyonu sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşumunda artışlar olduğuna ilişkin deneysel kanıtlar elde edilmiştir (1, 2, 3, 4, 7). İskemik dokuda serbest radikal oluşturan birçok potansiyel kaynak olmakla birlikte bunların başında ksantin oksidazın önemli

olduğu bildirilmiştir (3,4). Bu enzim çeşitli dokularda ksantin dehidrojenaz formunda sentez edilir ve doku iskemiyeye maruz kalırsa ksantin oksidaz formuna dönüşür. Ksantin oksidaz reperfüzyon başladığında ksantini ürik aside çevirirken süperoksit radikalini de aşağı çıkarır (1). Ksantin oksidaz inhibitörleri veya serbest radikal temizleyicileri ile tedavi edilen hayvanlarda post-iskemik doku harabiyetlerinin azaltılabildiği gösterilmiştir (12,13,14). Bizim çalışmamızda da allopurinol, post-iskemik serebral ödemi ve infarkt hacmini önemli ölçüde azalttı. Bu çalışmada olduğu gibi çoğu çalışmalarda allopurinol, deneysel iske mi oluşumundan birkaç gün önce uygulanmıştır çünkü; allopurinol'ün metaboliti oksipurinol, güçlü bir ksantin oksidaz inhibitörüdür (19).

İskemik dokularda serbest radikal yapımındaki artışa lipid peroksidasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir (10). Biyolojik membranlar lipid peroksidasyonuna duyarlıdır ve hücre membranında lipid peroksidasyonu membran permeabilitesini bozar ve kapiller permeabiliteyi artırarak ödeme yol açar (1). Bizim bu çalışmamızda lipid peroksidasyon düzeyi (MDA) ile serebral ödem ve infarkt hacmi arasında pozitif ilişkiler bulundu ve allopurinol uygulanan sıçanlarda lipid peroksidasyonu kontrol sıçanlara göre önemli ölçüde azaldı. Acaba allopurinol'ün post-iskemik nöron harabiyetini azaltıcı etkisi tümüyle ksantin oksidaz inhibisyonuna mı bağlı? Yapılan çalışmalara göre bunun böyle olabileceği söylenebilir. Ancak, bizim çalışmamızda post-iskemik SOD ve katalaz aktivitelerinin allopurinol ile önemli ölçüde korunmuş olması; enzimatik anti-oksidan savunma sistemi ile allopurinol arasında ilişkiler bulunabileceği olasılığını düşündürmektedir. SOD ve katalaz aktiviteleri ile allopurinol arasındaki ilişkilerin dolaylı mı yoksa doğrudan mı olduğunu kesin olarak söylemek için araştırmalara gereksinim olduğu kanısındayız.

Sonuç olarak bu çalışma; serebral iske mi periyodundan 48 saat önce allopurinol uygulanmaya başlanmasının sıçanlarda post-iskemik beyin harabiyetini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte SOD ve katalaz (enzimatik savunma sisteminin iki elemanı) aktiviteleri ile allopurinol arasında doğrudan veya dolaylı ilişkilerin bulunabileceğini de düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1- Mc Cord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985; 312: 159-163
- 2- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T: A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of  $\alpha$  tocopherol administration. Stroke 1982; 14: 977-982

- 3- Parks DA, Grange DN: Ischemia induced vascular changes role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245: G285-G289
- 4- Karthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE: The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985; 57: 599-609
- 5- Dormandy TL: An approach to free radicals. *Lancet* 1983; II: 1010-14
- 6- Fridovich I: Superoxide dismutases. *Annu Rev. Biochem* 1975; 44: 147-149
- 7- Slater TF: Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15
- 8- Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-9
- 9- Shlafer M, Kane PF, Wiggins VY, Kirsh MM: Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. *Circulation* 1982; 66: Suppl 1: 1-85-92
- 10- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML: The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 1980; 492: 91-119
- 11- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF: PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59: 612-619
- 12- Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY: Polyethylene glycolconjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989; 256: H589-H593
- 13- Werns SW, Shea MJ, Mitsos SE, Dysko RJ, Fantone JC, Schork MA, Abrams GD, Pitt B: Reduction of the size of infarction by allopurinol in the ischemic reperfused canine heart. *Circulation* 1986; 73: 518-524
- 14- Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz AL: Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1989; 20: 488-494
- 15- Bederson JB, Pitts LH, Germana SM: Evaluation of 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 1304-1308
- 16- Murklund S, Murklund G: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47: 496-474
- 17- Aebi H: Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984; 105: 121-126
- 18- Uchimaya M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analyt Biochem* 1978; 86: 271-278
- 19- Woodbury DM, Fingl E: Drugs employed in the therapy of gout, in Goodman LS, Gilman A (eds): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 5. New York Macmillan, 1975, pp 350-358