

# 2-Aminoetoksidifenil Borat'ın Akut Serebral İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkisi: Deneysel Bir Çalışma

Effect of 2-Aminoethoxydiphenyl Borate on Acute Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study

Tuba Demirci<sup>1</sup>, Nuray Bilge<sup>2</sup>, Özlem Özgül Abuç<sup>1</sup>, Nuh Çağrı Karaavcı<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Erzurum

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji ABD, Erzurum

<sup>3</sup> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji ABD, Erzurum

Yazışma Adresi / Correspondence:

**Tuba Demirci**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, 25240, Erzurum, TÜRKİYE

T: +90 505 713 63 44 E-mail: : drtubademirci@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.10.2019 Kabul Tarihi / Accepted : 13.02.2020

Orcid :

Tuba Demirci <https://orcid.org/0000-0002-8814-9648>

Nuray Bilge <https://orcid.org/0000-0002-9328-1678>

Özlem Özgül Abuç <https://orcid.org/0000-0001-9852-8839>

Nuh Çağrı Karaavcı <https://orcid.org/0000-0002-4316-3614>

(Sakarya Tıp Dergisi / Sakarya Med J 2020, 10(1):74-81) Doi: Doi: 10.31832/smj.637779

## Öz

Amaç	Serebral iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarında hücre ölümüne neden olan faktörlerin başında hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış gelmektedir. Depo kontrollü Ca <sup>2+</sup> girişi (Store operated Ca <sup>2+</sup> entry, SOCE), hücre içine Ca <sup>2+</sup> girişinden sorumludur ve Orai1, stromal etkileşim molekülü 1 (Stromal-interacting molecule1, STIM1) ve Stromal etkileşim molekülü 2 (Stromal-interacting molecule2, STIM2) proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. 2-Aminoetoksidifenil Borat (2-APB), hücreye depo kontrollü Ca <sup>2+</sup> girişini engelleyen kimyasal bir ajandır. Bu çalışmada deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan serebral I/R modelinde meydana gelen hasarda 2-APB'nin olası koruyucu etkisi araştırıldı.
Gereç ve Yöntemler	Çalışmada, on sekiz erkek sıçan 3 gruba ayrıldı (n=6). Sham grubunda cerrahi prosedür uygulandı ancak serebral I/R modeli oluşturulmadı. Serebral I/R ve serebral I/R-2APB grubundaki sıçanlara I/R modeli oluşturuldu. Bir saat sonra reperfüzyon sağlandı. Serebral I/R-2APB grubundaki sıçanlara reperfüzyondan 10 dk önce 2-APB uygulandı. Reperfüzyondan 3 saat sonra sıçanlara ötenazi uygulanarak beyinleri çıkarıldı. Sıçan beyin dokularında meydana gelen değişiklikler histokimyasal yöntemlerle, TUNEL metoduyla ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.
Bulgular	Serebral I/R grubunda, sham grubuna kıyasla histolojik yapının bozulduğu, apoptozun ve Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerinin ekspresyonunun arttığı belirlendi. 2-APB uygulanan grupta ise doku hasarının ve apoptotik hücrelerin azaldığı, Orai1, STIM1 ve STIM2 ifadesinin belirgin şekilde inhibe edildiği ortaya konuldu.
Sonuç	Sonuç olarak, serebral I/R hasarlı dokuda 2-APB'nin hücreye SOCE aracılı Ca <sup>2+</sup> girişini azaltarak apoptozun ve nöronal hasarın azaltılmasında etkili olabileceği ortaya konuldu.
Anahtar Kelimeler	serebral iskemi; iskemi-reperfüzyon hasarı; apoptoz; 2-aminoetoksidifenil borat

## Abstract

Objective	In cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury, an increase in intracellular calcium concentration is the leading factor in cell death. The store-operated Ca <sup>2+</sup> entry (SOCE) is responsible for Ca <sup>2+</sup> entry into the cell and takes place mediated by the Orai1, Stromal-interacting molecule1 (STIM1), and Stromal-interacting molecule2 (STIM2) proteins. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) is a chemical agent that prevents store-operated Ca <sup>2+</sup> entry into the cell. In this study, it was investigated the possible protective effect of 2-APB on the occurred injury in the experimental cerebral I/R model in rats.
Materials and Methods	In the study, eighteen male rats were divided into three groups (n=6). In the Sham group, only surgical procedure was applied without cerebral I/R model. Ischemia-reperfusion model was created for rats in the cerebral I/R and cerebral I/R-2APB groups. Reperfusion was realized one-hour later. Ten-minutes before reperfusion, 2-APB was administered to the rats in the cerebral I/R-2APB group. After three hours of reperfusion, the rats were sacrificed and their brains were removed. The changes that occurred in the brain tissues were investigated by using histochemical methods, the TUNEL, and immunohistochemical staining.
Results	In the cerebral I/R group, it was determined that the histological structure was impaired and apoptosis and expression of Orai1, STIM1, and STIM2 proteins were increased compared to the sham group. In the 2-APB administrated group, it was revealed that the tissue damage and apoptotic cells were decreased, and Orai1, STIM1, and STIM2 expression were significantly inhibited.
Conclusion	As a result, it has been demonstrated that 2-APB may be effective in decreasing apoptosis and neuronal damage by reducing SOCE-mediated Ca <sup>2+</sup> influx into the cell in cerebral I/R damaged tissue.
Keywords	cerebral ischemia; ischemia-reperfusion injury; apoptosis; 2-aminoethoxydiphenyl borate

## Giriş

Beyin iskemisi insan sağlığını olumsuz olarak etkileyen ve yaşamı için tehdit oluşturan bir durumdur.<sup>1</sup> İskemik beyin hasarı, nöronların yetersiz oksijene maruz kalması sonucu ortaya çıkan karmaşık bir süreçtir.<sup>2</sup> Serebral iskemide reperfüzyon (İ/R) yaralanması, lökosit infiltrasyonu, oksidatif stres, kalsiyum artışı, beyin-kan bariyerinin bozulması, kılcal damarlarda hipoperfüzyon ve mikrodamar hiperpermeabilitesi gibi birçok durum ile ilişkilidir.<sup>3,4</sup> Ancak İ/R sonrası meydana gelen hücre hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Sitolitik  $Ca^{+2}$  birikimi hücre ölümünde önemli bir rol oynar. İskemi sırasında, dokuda oksijen eksikliği sonucu oluşan hasar ve ATP azalmasına bağlı olarak hücrede hemoastazi sağlamak için membran iyon pompa düzeylerinde azalma olur. Hücre içi depolardan  $Ca^{+2}$  sızması hücre membranında depo kontrollü  $Ca^{+2}$  kanallarının (Store operated canal, SOC) aktivasyonuna ve sitosolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda artışlara neden olur. Hücrede,  $Ca^{+2}$  fazlalığı sonucu sitokrom c, apoptoz teşvik edici faktör ve diğer birtakım moleküllerin salınımı artar ve bu durum hücre ölümüne neden olur.<sup>5,6</sup> Hücreler, sitoplazmalarında  $Ca^{+2}$  seviyelerini, çeşitli gelişmiş mekanizmalar aracılığı ile düşük tutarlar. Bu mekanizmalardan biri özelleşmiş hücre organelleri içerisinde  $Ca^{+2}$  depolanmasıdır. Endoplazmik retikulum, hücre içerisinde önemli bir  $Ca^{+2}$  depo organeldir.<sup>7</sup> Depo kontrollü  $Ca^{+2}$  girişi (Store operated  $Ca^{+2}$  entry, SOCE), endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımı ile başlayan bir durumdur ve plazma membranı aracılığıyla hücreye sürekli  $Ca^{+2}$  akışı sağlar. Hücreye  $Ca^{+2}$  girişi, endoplazmik retikulumun doluluk durumuna göre belirlenir. SOCE'nin, endoplazmik retikulumlardan  $Ca^{+2}$  boşalmasını sağlama ve depo kontrollü  $Ca^{+2}$  girişini sağlayan kanalları aktive etme gibi işlevleri vardır. Diğer bir görevi de; endoplazmik retikulumun  $Ca^{+2}$  ile dolması ve bu doludan sonra reseptörler aracılığı SOC'ların inaktive olmasıdır.<sup>8,9</sup> Stromal etkileşim molekülü 1 (Stromal-interacting molecule1, STIM1) proteini endoplazmik retikulumda bulunur ve farklı fonksiyonlara sahiptir. Lümen kısmında  $Ca^{+2}$  bağlayıcı bir domaini vardır. Bu domain bu proteinin endoplazmik retikulum içindeki  $Ca^{+2}$

değişikliklerini algılamasını sağlar.<sup>10</sup> STIM1, endoplazmik retikulum içinde  $Ca^{+2}$  seviyesi düştüğünde yapısal değişikliğe giderek oligomerize olur ve yer değiştirerek endoplazmik retikulum-plazma membranı bağlantısı oluşturur. Plazma membranı üzerinde bulunan seçici SOC olan Orai1 kanalları açılır ve matrisden sitozole  $Ca^{+2}$  geçişini sağlar. Endoplazmik retikulum-plazma membranı bağlantıları, endoplazmik retikulum  $Ca^{+2}$  ile geri dolunca yerinden ayrılır ve Orai1 kanalları kapanır. Böylelikle plazma membranından sitozole  $Ca^{+2}$  akışı durur.<sup>11-14</sup>

İskemik olaylarda SOCE artışıyla dokuda hasar meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda global beyin iskemisi oluşturulmuş ve iskemide erken dönemde SOCE, STIM1 siRNA kullanılarak baskılanmıştır. Sonuç olarak da, STIM1 ve Orai1 ifadesinin belirgin şekilde inhibe edildiği ve nöronlarda  $Ca^{+2}$  azaldığı, hatta STIM1 siRNA enjeksiyonundan sonra sıçanların nörolojik fonksiyonlarının iyileştiği tespit edilmiştir.<sup>15</sup>

Hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki artışlar hemen hemen bütün hücre tiplerinde farklı fonksiyonları kontrol ederler.<sup>16</sup> 2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB), endoplazmik retikulumda bulunan inozitol trifosfat (IP3) reseptörlerini bloke ederek  $Ca^{+2}$  salınımını inhibe eden kimyasal bir ajandır.<sup>17</sup> 2-APB,  $Ca^{+2}$  salınımını inhibe etmek ve  $Ca^{+2}$ 'yi azaltmak amacıyla birçok çalışmada kullanılmıştır.<sup>18</sup>

Literatürde serebral iskemide ve reperfüzyon hasarında 2-APB'nin etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada SOCE inhibitörü olan 2-APB'nin serebral iskemide ve reperfüzyon hasarı üzerindeki olası koruyucu ve tedavi edici etkisi araştırıldı.

## Gereç ve Yöntemler

**Deney Hayvanları:** Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 30.06.2016 tarih ve 124 nolu kararı ile onaylandı ve tüm uygulamalar Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanım Kılavuzu prensiplerine göre hayvan hakları korunarak gerçekleştirildi. Hayvanlar,

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alındı ve çalışma aynı merkezde 2016 yılı Kasım ayı içinde gerçekleştirildi. Çalışmada, 250-300 g arasında vücut ağırlığına sahip 18 adet erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı.

**Deneysel Tasarım:** Sıçanlar her bir grupta 6 adet olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Gruplar, sham grubu (Grup I, n= 6), serebral iske mi/reperfüzyon (İ/R) grubu (Grup II, n= 6) ve serebral iske mi/reperfüzyon+2APB (İ/R+2APB) grubu (Grup III, n=6) olarak belirlendi. Sıçanlara ketamin (100 mg/kg) ve klorpromazin (25 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonla verilerek anestezi sağlandı. Çalışmada orta serebral arter iske mi ve reperfüzyonunu sağlamak için boynun ön bölümünde yaklaşık 3 cm'lik orta hat insizyonunu yapıldı. Sağ karotis kom münis, eksternal ve internal karotid arterler ortaya çıkarıldı. Sağ eksternal karotid arterden silikon kaplı naylon filamentle girilerek internal karotid artere ilerlendi ve hafif bir direnç hissedildiği zaman monofilamentin orta serebral artere ulaştığı kabul edildi. Cilt kapatılarak operasyona son verildi. Bir saatlik iske mi süresi sonunda filament çıkarılarak reperfüzyon sağlandı.<sup>19,20</sup> Reperfüzyondan 10 dk önce 2-APB 4 mg/kg dozuyla intraperitoneal olarak uygulandı.

**Nörolojik Durumun Değerlendirilmesi:** Reperfüzyondan 3 saat sonra deney hayvanlarının davranışları nörolojik yönden incelendi. Motor ve davranışsal değişimler 0-4 puan arasında skorlama yapılarak değerlendirildi.<sup>20-22</sup> Bu skorlamaya göre;

0 puan: nörolojik defisit yok

1 puan: lezyonun karşı tarafındaki ayakta fleksiyon ve güç kaybı

2 puan: yürürken güç kaybının olduğu tarafa doğru dönerek daire çizme

3 puan: hafif itme sonucunda güç kaybının olduğu tarafa düşme

4 puan: spontan olarak yürüyememe ve bilinç düzeyinde azalma

Nörolojik durumun değerlendirilmesinin ardından sıçan-

lara ötenazi uygulandı ve sakrifiye edilen hayvanların beyinleri alındı.

**Sıçan Beyinlerinin Histolojik Analizi:** Beyin dokuları %10'luk nötral formalin içinde 72 saat boyunca fikse edildi, daha sonra dereceli alkol serilerinden ve 3 farklı ksilenlerden geçirilerek sırasıyla dehidrate edildi ve şeffaflaştırıldı. Eriyik haldeki parafinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömülen beyin dokularından mikrotom (Leica RM2235, Leica Instruments, Nussloch, Germany) ile 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Histolojik inceleme için kesitler Hematoksilen-Eozin (H-E) boyasıyla boyandı ve kamera ataçmanlı Nikon Eclips E600 (Tokyo, Japan) mikroskop altında değerlendirilerek resimleri çekildi.

**TUNEL Metodu:** Beyin hasarının derecesi ve beyinde apoptoz varlığı, In Situ Cell Death Detection Kiti (Indianapolis, IN, USA) kullanılarak TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) analizi ile belirlendi. Normal nöronlar soluk ve mavi olarak görülürken, apoptotik nöronlar koyu kahverengi boyandı. Slaytlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japan) altında incelendi ve her beyin kesitinde, rasgele seçilen 10 farklı alanda, TUNEL pozitif ve normal nöronlar sayılarak apoptotik indeks hesaplandı (büyütme, 200x). TUNEL pozitif nöronların tüm nöronlara oranı olan apoptotik indeks yüzde olarak ifade edildi.<sup>23,24</sup>

**Orai1, STIM1 ve STIM2 Proteinlerinin İmmünohistokimyasal Analizi:** Parafin bloklardan pozitif şarjlı lamalar üzerine alınan 5 µ kalınlığındaki kesitlerde STIM1, STIM2 ve Orai1 (Santa-Cruz) proteinlerinin ekspresyonunu belirlemek amacıyla immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı. Boyama işlemi VENTANA BenchMark GX System (Ventana Medical Systems) cihazında otomatik olarak gerçekleştirildi ve Ultraview Universal DAB Detection Kit kullanıldı. STIM1, STIM2 ve Orai1 primer antikorları sırasıyla 1/100, 1/100 ve 1/50 oranlarında dilüe edilerek kesitlerin üzerine damlatıldı ve 37°C'de 32 dk inkübe edildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra slaytlar entellan ile kapatılarak Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo,

Japan) ışık mikroskobu altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. Her grup için Orai1, STIM1 ve STIM2 immüno-reaktivitesi semi-kantitatif bir metot kullanılarak değerlendirildi ve immünoreaktivite skorları (İRS) hesaplandı (Tablo 1).<sup>25</sup>

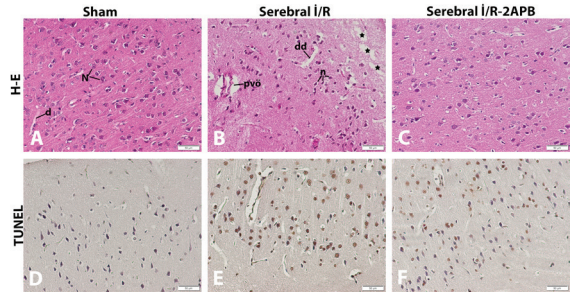
A (pozitif hücrelerin yüzdesi)	B (boyanma yoğunluğu)	İRS skoru (A × B)
0 = pozitif hücre yok	0 = boyanma yok	0-1 = negatif
1 = pozitif hücreler <% 10	1 = hafif boyanma	2-3 = hafif
2 = pozitif hücreler %10-50	2 = orta derecede boyanma	4-8 = orta
3 = pozitif hücreler %51-80	3 = yoğun boyanma	9-12 = güçlü pozitif
4 = pozitif hücreler >80%		

**İstatistiksel Analiz:** Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics Version 20 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçların gruplar arası karşılaştırılmasında, istatistiksel farklılıklar ve önem seviyelerinin belirlenmesinde nonparametrik bir test olan Kruskal-Wallis Testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma (ort±SS) olarak verildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

**Serebral İ/R Uygulanmış Sıçan Beyinlerinde 2-APB'nin Nörolojik Defisit Skoru Üzerindeki Etkisi:** Her üç gruptaki sıçanların ortalama nörolojik defisit skorları sham grubunda 0,17±0,41, serebral İ/R grubunda 3,33±0,52, serebral İ/R-2APB grubunda 2,17 ± 0,75 idi ve gruplar arasında farklılık vardı (p=0,001). Serebral İ/R grubuna ait nörolojik defisit skoru sham grubundakinden anlamlı derecede yüksekti (p=0,002). Bununla birlikte, bu artışın ve serebral İ/R hasarında görülen nörolojik defisitlerin 2APB'nin verilmesiyle belirgin şekilde azaldığı görüldü (p=0,016).

**Serebral İ/R Uygulanmış Sıçan Beyinlerinde 2-APB'nin Histolojik Bulgular Üzerindeki Etkisi:** Sham grubuna ait beyin kesitlerinde kortekste nöron hücreleri sıkıca hizalanmıştı, nükleolusları ve nükleer kromatini belirgindi (Şekil 1A). Serebral İ/R grubunda beyin korteksinde nöronlar gevşek şekilde hizalanmıştı, hücresel pleomorfizm, sitoplazmik büzüşme ve koyu boyanan nöronlarda piknotik çekirdek varlığı dikkat çekiciydi. Bu nöronların çekirdekleri belirgin değildi ve yoğun eozinofilik boyanan sitoplazmaya (red nöron) sahiplerdi. Ayrıca kortekste nöropilde vakuolizasyonla birlikte yaygın interstisyel ödem ve nekrotik değişiklikler görülmekteydi. Ek olarak vasküler yapılarda genişleme, konjesyon ve perivasküler ödem izlendi (Şekil 1B). Serebral İ/R'den önce 2-APB verilmesiyle sıçan beyininde görülen vasküler konjesyon ve nekrotik değişikliklerin belirgin olarak azaldığı izlendi. Nöronların görünümü ve düzenlenişi sham grubuna yakındı (Şekil 1C).



Şekil 1. Tüm gruplara ait beyin kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri. A, B ve C: H-E ile boyanmış kesitler. N: normal nöron, d: damar, n: piknotik görünümlü kırmızı nöronlar, dd: dilate damar, pvö: perivasküler ödem, \*: vakuolizasyonla birlikte görülen yaygın interstisyel ödem. D, E ve F: TUNEL metoduyla boyanmış kesitler. TUNEL pozitif nöronlar koyu kahverengi renkte görülmekte. Barlar: 50 mikrometre.

**Serebral İ/R Uygulanmış Sıçan Beyinlerinde 2-APB'nin Nöronal Apoptoz Üzerindeki Etkisi:** Serebral İ/R hasarında apoptoz sonucu ortaya çıkan nöronal kaybı değerlendirmek ve 2-APB'nin nöronal apoptoz üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla TUNEL metodu kullanıldı ve TUNEL pozitif hücreler değerlendirildi. Serebral İ/R grubu, sham grubuyla karşılaştırıldığında apoptotik indekste bir

artış olduğu tespit edildi ( $p=0,004$ ) (Şekil 1D ve 1E) (Tablo 2). Serebral İ/R-2APB grubunda ise apoptotik indeks

serebral İ/R grubuna kıyasla belirgin bir şekilde azalmıştı ( $p=0,004$ ) (Şekil 1F) (Tablo 2).

**Tablo 2. Tüm gruplara ait apoptotik indeks ve Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerinin İRS skorları**

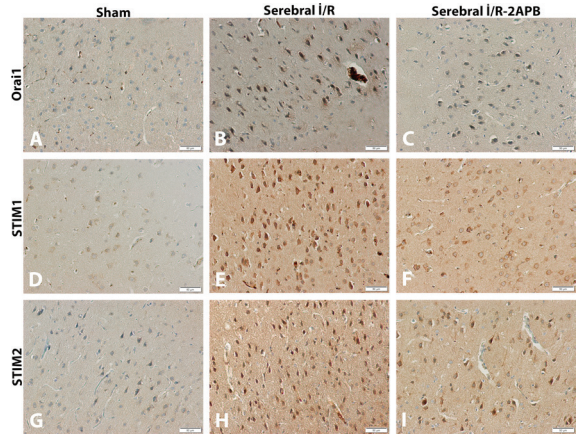
Skorlar	Sham (ort±SS)	Serebral İ/R (ort±SS)	Serebral İ/R -2APB (ort±SS)	p değeri
Apoptotik indeks	0,08±0,015	0,78±0,08	0,14±0,03	0,004
Orai1 İRS skoru (ort±SS)	0,33±0,52	9,50±2,26	4,17±1,60	0,006
STIM1 İRS skoru (ort±SS)	0,67±0,81	10,00±2,45	4,83±1,32	0,007
STIM2 İRS skoru (ort±SS)	0,83±0,98	9,50±1,22	5,33±1,03	0,002

İ/R: iskemi-reperfüzyon  
İRS: immünoreaktivite skoru  
2APB: 2-Aminoetoksidifenil Borat  
ort: ortalama  
SS: standart sapma

Sonuçlarımız, serebral İ/R durumunda reperfüzyondan önce 2-APB uygulanmasının beyinde nöronal apoptozu önlediğini gösterdi.

### Serebral İ/R Uygulanmış Sıçan Beyinlerinde 2-APB'nin Orai1, STIM2 ve STIM1 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi:

Hücreye depo kontrollü  $Ca^{+2}$  girişinde önemli rol oynayan Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerinin immünoaktivitesi İRS skoru hesaplanarak belirlendi. Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerinin İRS skoru, serebral İ/R grubunda sham grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yüksekti ( $p=0,003$ ) (Tablo 2) (Şekil 2B, 2E ve 2H). Serebral İ/R-2APB grubunda her üç proteine ait İRS skorunda serebral İ/R grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş izlendi (sırasıyla  $p=0,06$ ,  $p=0,07$  ve  $p=0,002$ ) (Tablo 2) (Şekil 2C, 2F ve 2I). Çalışmamızda, 2-APB'nin, serebral İ/R sonrası sıçanların beyinlerinde artan Orai1, STIM1 ve STIM2 protein seviyelerini azalttığını gözlemledik.



Şekil 2. Tüm gruplara ait beyin kesitlerinde Orai1, STIM1 ve STIM2 protein ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Barlar: 50 mikrometre.

### Tartışma

Vasküler nedenlerle meydana gelen iskemik beyin hasarları ölümlerle sonuçlanabilen ciddi klinik durumlardır. Tedavi maliyetinin yüksek olması ve hastalarda iş gücü kaybına yol açması nedeniyle tedavisinin erken ve etkili yapılması büyük önem taşımaktadır.<sup>26</sup> İskeminin genişliği ve süresi-ne bağlı olarak hücrel hasarın derecesi belli olur. Tedavi trombolitik ajanların kullanılması ile iskemik hasara



ek olarak reperfüzyon hasarı da gündeme gelmiştir. Kan akımının yeniden sağlanması ile oluşan reperfüzyon, mevcut hasarı daha da artırabilir.<sup>5</sup> Yani iskemik beyin dokusunda kan akımının yeniden gerçekleşmesi fonksiyonel olarak düzelmeyi tam anlamıyla sağlayamamaktadır.<sup>27</sup> İskemi-reperfüzyon hasarının patogeneğinde pek çok faktör rol oynamaktadır. Son zamanlarda hücrel  $Ca^{+2}$  homeostazının İ/R hasarını önlemek için önemli bir strateji olduğu üzerinde durulmaktadır.<sup>28,29</sup> Sağlıklı beyin dokusunda ekstrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu intrasellüler kalsiyum konsantrasyonundan daha yüksektir ve bu durum beyin ihtiyacına göre düzenlenir. İskemik bir beyinde artan ATP kaybı, intrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artmasına ve normal fizyolojik yolların aşırı uyarılması ile nöronal hasara neden olur.<sup>30-32</sup> İnmede, endoplazmik retikulumda oluşan  $Ca^{+2}$  dengesizliği beyin hasarına neden olmaktadır.<sup>33</sup> Hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki artışlar hemen hemen bütün hücre tiplerinde farklı fonksiyonları kontrol ederler.<sup>16</sup> Serebral İ/R hasarında intrasellüler  $Ca^{+2}$  miktarının artmasına neden olan SOCE aktive olmakta ve onunla ilişki Orai1 ve STIM1 proteinlerinin ekspresyonu artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda global iskemik oluşturulmuş ve iskemik sonrası erken dönemde SOCE'nin STIM1 siRNA kullanılarak baskılanması sonucu, STIM1 ve Orai1 ifadesinin belirgin şekilde inhibe edildiği ve nöronlarda  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun azaldığı, hatta STIM1 siRNA enjeksiyonundan sonra sıçanların nörolojik fonksiyonlarının iyileştiği tespit edilmiştir. Başka bir ifadeyle, STIM1 ve Orai1'in fazla ifadesi, iskemik hasar sonucu hücreye aşırı miktarda  $Ca^{+2}$  girişinden sorumludur ve bu girişin inhibe edilmesi nöronal sağlığını artırmaktadır. Bu veriler, SOCE'nin iskemik hasarda nöronal hücre ölümünden sorumlu eksitotoksisite dışında bir diğer mekanizma olduğunu desteklemektedir.<sup>15</sup> Kalsiyum kanal blokleri olan verapamilin over dokusunda İ/R hasarının önlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir.<sup>34</sup> 2-APB bir SOCE inhibitörüdür ve birçok çalışmada over, karaciğer, böbrek, testis ve kulak gibi organlarda İ/R hasarını azaltmak amacıyla kullanılmıştır.<sup>35-39</sup> 2-APB, İ/R yaralanması sonucu oluşan patofizyolojik yolların farklı aşamalarını hedefleyebilir ve

etki mekanizmasının en iyi yolu, hücre içi kalsiyum birikimini ve apoptoza yol açan olayları önlemektir.<sup>36,40</sup>

Çalışmamızda serebral İ/R modeli oluşturulan sıçanlara reperfüzyondan 10 dk önce bir SOCE inhibitörü olan 2-APB verilerek beyinde oluşabilecek hasarı önlemede rolü olup olmadığı araştırıldı. Sham grubundaki sıçanlarda nörolojik defisit yoktu ve serebral İ/R modeli uygulanan sıçanlarda belirgin bir nörolojik defisit izlendi. Serebral İ/R hasarı oluşturulan sıçanlara reperfüzyondan önce 2-APB verilmesiyle, bu hasar sonucu klinik olarak ortaya çıkan nörolojik defisitlerin azaldığı belirlendi. Sıçan beyinleri histolojik olarak incelendiğinde de beyin dokusundaki intersitisyel ödemin ve apoptozun azaldığı gözlemlendi ve ilaveten SOCE ile ilişkili proteinler olan Orai1, STIM1 ve STIM2'in ekspresyonlarında da bir azalma tespit edildi. Serebral İ/R modeli yapılan çalışmalarda histolojik olarak kortekste gevşek düzenlenmiş nöronlar ve koyu renkli piknotik nükleusların görüldüğü, özellikle serebellar korteksteki nöronların zarar gördüğü ve kırmızı nöronlar olarak adlandırılan eosinofilik boyanmış zarar görmüş nöronların varlığı belirtilmiştir.<sup>41,42</sup> Işık mikroskopik incelemede sham grubunda serebral kortekste nöron ve damar yapıları normaldi. Serebral İ/R uygulanan grupta özellikle kortekste hasar vardı ve bol miktarda dağınık halde görülen piknotik çekirdekli nöronlar izlendi. 2-APB verilen sıçanların beyinlerinde kırmızı nöronlar belirgin şekilde azalmıştı ve nöronlar serebral İ/R grubuna göre daha düzenli olarak dizilmişti. Yapılan başka bir çalışmada, serebral İ/R oluşturulan sıçan beyinlerinde H-E boyamada vakuolizasyonlarla birlikte ödemi bir morfolojinin varlığı rapor edilmiştir.<sup>43</sup> Çalışmamızda da serebral İ/R grubunda, beyin korteksinde interstisyel ödem belirlendi ve 4 mg/kg doz 2-APB uygulanan serebral İ/R +2APB grubunda bu ödemin azaldığı tespit edildi.

TUNEL analizi, nükleustaki DNA kırıklarının tespit edilmesini sağlayarak apoptozun tanınmasını sağlayan bir yöntemdir.<sup>44,45</sup> Çalışmamızda sıçanların beyin korteksindeki apoptotik hücreler TUNEL metodu ile gösterildi.

Serebral İ/R oluşturulan sıçanlarda TUNEL pozitif hücrelerde sham grubundakilere göre belirgin bir artış vardı. Reperfüzyondan önce 4 mg/kg dozunda 2-APB uygulanan grupta iskemi grubuna göre TUNEL pozitif nöronlarda anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. Yaptığımız histolojik incelemeler, reperfüzyondan önce 2-APB uygulanmasının serebral İ/R hasarında meydana gelen yapısal hasarı hafiflettiğini, apoptotik hücre sayısını azalttığını ve beyini apoptozdan koruyabileceğini gösterdi.

İskemide nöronal hücre ölümünün başlıca mediatörünün  $Ca^{+2}$  olduğuna inanılmaktadır. İskemi ve enerji eksikliğine yol açan diğer durumlarda ekstrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu hızlı bir şekilde azalırken, intrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu yükselir. Hücreye  $Ca^{+2}$  girişi başlangıçta NMDA reseptörlerinin aktive olmasıyla gerçekleşir. Daha sonra bu reseptörler inaktive olur ve takiben L-tipi voltaj-bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları, internal depolardan  $Ca^{+2}$  salınımı ve  $Ca^{+2}$  tamponlama mekanizmaları gibi başka yollarla hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artırılır.<sup>46</sup> SOCE inhibitörleri olan 2-APB, SKF96365 ve La3+ ile yapılan çalışmalarda, hipokampal nöronların spontan sinaptik aktivite ve sinaptik plastisitesinde SOCE'nin rolü olduğu ve nöronal  $Ca^{+2}$  sinyalizasyonu ile SOCE arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.<sup>47,48</sup> İntrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun uzun süre yüksek olması iskemik nöronal hücre ölümü açısından kritik öneme sahiptir. Hipoksi, endoplazmik retikulum içine ATP bağımlı  $Ca^{+2}$  geçişini inhibe eder. Böylece STIM2'nin sürekli aktif halde olmasını ve SOCE'nin indüklediği sitozolik  $Ca^{+2}$  birikmesini tetikler. Orai1 ve STIM proteinleri hem normal beyin fonksiyonu hem de nörolojik bozukluklarda önemli rol oynar. STIM1 genellikle serebellar nöronlarda ifade edilirken, STIM2 hipokampal ve kortikal nöronlarda bol bulunur.<sup>49</sup> Çalışmamızda gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için immunohistokimyasal boyama ile Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerinin ekspresyonu incelendi. İmmunohistokimyasal boyama sonucu belirlenen Orai1, STIM1 ve STIM2 immünoreaktivitesi İ/R grubunda, sham grubuna göre daha yüksekti. Reperfüzyondan önce 2-APB verilmesiyle her üç proteinin eks-

presyonunda azalma belirlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda sıçan beyninde, SOCE ile ilişkili Orai1, STIM1 ve STIM2 proteinlerin ekspresyonunun İ/R durumunda arttığı ve reperfüzyondan önce 2-APB'nin 4 mg/kg dozunda verilmesiyle bu proteinlerin ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Ayrıca nöronal hasar, vasküler konjesyon, nöropilde görülen yaygın interstisyel ödem ve nekrotik değişikliklerde de düzelme ve nöronal apoptozda azalma saptandı. Bu sonuç bir SOCE inhibitörü olan 2-APB'nin hem antiapoptotik etkiyle hem de hücreye SOCE aracılığıyla  $Ca^{+2}$  girişini kontrol ederek nöroprotektif etki gösterdiğini ve sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan serebral İ/R hasarını önleyebildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, 2-APB'nin doza ve zamana bağlı etkisi araştırılmamıştır. Ancak, daha ileri çalışmalar ile bulgularımızın desteklenmesi durumunda 2-APB'nin serebral İ/R hasarı ve ilişkili diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde yer alabileceği düşünülebilir.

### Çıkar İlişkisi

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Kaynaklar

1. Pei Z, Ho HT, Cheung RT. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a permanent middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. *Neurosci Lett* 2002; 318: 141-4.
2. Matsuo Y, et al. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 1994; 656: 344-52.
3. Lerouet D, Beray-Berthet V, Palmier B, Plotkine M, Marguill I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2002; 958: 166-75.
4. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 298: 229-317.
5. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 135-59.
6. Farber JL. The role of calcium in lethal cell injury. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 503-8.
7. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; 32: 235-49.
8. Putney JW, Jr. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium* 2007; 42: 103-10.
9. Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 2009; 231: 10-22.
10. Cahalan MD. STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 669-77.
11. Liao Y, et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/lcrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2895-900.
12. Kim MS, et al. Native Store-operated Ca2+ Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1. *J Biol Chem* 2009; 284: 9733-41.
13. Liao Y, et al. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4682-7.
14. Liao Y, et al. A role for Orai in TRPC-mediated Ca2+ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca2+ entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3202-6.
15. Zhang M, et al. Suppression of STIM1 in the early stage after global ischemia attenuates the injury of delayed neuronal death by inhibiting store-operated calcium entry-induced apoptosis in rats. *Neuroreport* 2014; 25: 507-13.
16. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol* 2008; 2: 879-89.
17. Janaky M, Grosz A, Toth E, Benedek K, Benedek G. Hypobaric hypoxia reduces the amplitude of oscillatory potentials in the human ERG. *Doc Ophthalmol* 2007; 114: 45-51.
18. Tinjust D, Kergoat H, Lovasik JV. Neuroretinal function during mild systemic hypoxia. *Aviat Space Environ Med* 2002; 73: 1189-94.
19. Chen Y, et al. LLDLT-8 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing post-stroke inflammation. *Journal of pharmacological sciences* 2016; 131: 131-37.
20. Bonova P, Burda J, Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M. Delayed post-conditioning reduces post-ischemic glutamate level and improves protein synthesis in brain. *Neurochemistry international* 2013; 62: 854-60.
21. Bederson JB, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *stroke* 1986; 17: 472-76.
22. YANIK B, GÖRGÜLÜ A, KIRIŞ T, ÇOBANOĞLU S. FOKAL SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE NİMODİPİN VE MEMANTİNİN ETKİLERİ.
23. Hei Y, et al. Neuregulin1 attenuates cognitive deficits and hippocampal CA1 neuronal apoptosis partly via ErbB4 receptor in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Behavioural brain research* 2019; 365: 141-49.
24. Chen G, Shi J, Hu Z, Hang C. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine. *Mediators of inflammation* 2008; 2008.
25. Fedchenko N, Reifennath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol* 2014; 9: 221.
26. Demir R, et al. Genç İskemik Stroklu Hastalarda Protrombotik Gen Polimorfizmleri ve Strok Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. *Sakarya Tıp Dergisi* 2014; 4: 119-24.
27. Kavaklı A, Acet A, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna A. Ratlarda beyin İskemi-reperfüzyonu sonucu oluşan morfolojik değişikliklere melatonin ve pinealektominin etkisi. *FÜ Sağ. Bil. Derg* 2007; 21: 63-66.
28. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. Mitochondrial Ca2+ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci* 2006; 11: 2554-64.
29. Trocha M, Szeląg A. The role of calcium and calcium channel blocking drugs in damage to the liver preserved for transplantation. *Ann Transplant* 2004; 9: 5-11.
30. Victor M, Ropper AH, Adams RD. Adams and Victor's principles of neurology. Baskı. 2001.
31. Warlow C, et al. Preventing recurrent stroke and other serious vascular events. *Stroke: a practical guide to management* 2001: 653-722.
32. Ataş E, et al. Deneysel Serebral İskemi-Reperfüzyon Hasarında Bosentanın Koruyucu Etkisi. *Türk Beyin Damar Hastalıkları Dergisi* 2013; 19: 46-50.
33. Secondo A, et al. ORAI1/STIM1 Interaction Intervenes in Stroke and in Neuroprotection Induced by Ischemic Preconditioning Through Store-Operated Calcium Entry. *stroke* 2019; 50: 1240-49.
34. Sagsoz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod* 2002; 17: 2972-6.
35. Taskin MI, et al. Effect of 2-aminoethoxydiphenyl borate on ischemia-reperfusion injury in a rat ovary model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 178: 74-9.
36. Nicoud IB, et al. 2-APB protects against liver ischemia-reperfusion injury by reducing cellular and mitochondrial calcium uptake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G623-30.
37. Yildar M, et al. Protective effect of 2-aminoethyl diphenylborinate on acute ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Surg Res* 2014; 187: 683-9.
38. Sari E, et al. Protective effect of 2-APB on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Urol* 2015; 193: 1036-41.
39. Kaymakci M, et al. The Potential Protective Effects of 2-aminoethyl Diphenylborinate against Inner Ear Acoustic Trauma: Experimental Study Using Transmission and Scanning Electron Microscopy. *J Int Adv Otol* 2015; 11: 1-5.
40. DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW, Jr. Complex actions of 2-aminoethyl diphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 2008; 283: 19265-73.
41. Yang ML, Tao T, Xu J, Liu Z, Xu D. Antiapoptotic Effect of Gene Therapy with Recombinant Adenovirus Vector Containing Hypoxia-inducible Factor-1alpha after Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130: 1700-06.
42. Dimopoulos C, et al. Expression of S100B Protein in Ischemia/Reperfusion-Induced Brain Injury After Cyclosporine Therapy: A Biochemical Serum Marker with Prognostic Value? *Med Sci Monit* 2019; 25: 1637-44.
43. Wan J, et al. Protective effect of Danhong Injection combined with Naioxintong Capsule on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2018; 211: 348-57.
44. Lorrio S, Negrodo P, Roda JM, Garcia AG, Lopez MG. Effects of memantine and galantamine given separately or in association, on memory and hippocampal neuronal loss after transient global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 2009; 1254: 128-37.
45. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res* 1994; 278: 549-56.
46. Osborne NN, et al. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23: 91-147.
47. Emptage NJ, Reid CA, Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca2+ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 2001; 29: 197-208.
48. Baba A, et al. Activity-evoked capacitative Ca2+ entry: implications in synaptic plasticity. *J Neurosci* 2003; 23: 7737-41.
49. Kraft R. STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels (Austin)* 2015; 9: 245-52.