

TRAVMATİK SPİNAL LEZYONLU OLGULARDA İNTRASELLÜLER ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ

Hakan Fıçıcılar* • Sema Yavuzer* • Gülriz Ersöz* • Rezzan Yorgancıoğlu**
Mehtap Pasin* • Murat Çelebi*

ÖZET

Spinal kord travmatik yaralanmalarının neden olduğu doku harabiyetinin patofizyolojisinde serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyon önemli bir role sahiptir. Lipid peroksidasyonu inhibe eden ve/veya oksijen radikallerini temizleyen bileşiklerin posttravmatik patolojik süreçleri bloke ettiği ve fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı ileri sürülmektedir. Sunulan çalışma, travmatik spinal lezyonlu paraplejik hastalarda hücrel antioksidan savunma düzeyini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiş ve olgularda eritrosit SOD ve CAT enzim aktiviteleri sağlıklı bireylere göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Bulgular spinal kord lezyonlu hastalarda ciddi bir oksidan stresin varlığını işaret eder niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Spinal kord travmatik lezyonları, serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar

SUMMARY

Intracellular Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Traumatic Spinal Cord Injury

Free oxygen radicals and lipid peroxidation have an important role in pathophysiology of tissue damage caused by traumatic spinal cord injuries. It is suggested that compounds that inhibit lipid peroxidation and/or scavenge oxygen radicals can block posttraumatic pathologic processes and promote functional recovery. The present study was performed in order to investigate cellular antioxidant defence in patients with traumatic spinal cord injured paraplegia and erythrocyte SOD and CAT enzyme activities were found significantly lower in the patients than those in healthy subjects. Findings indicate that a serious oxidant stress exists in patients with spinal cord injury.

Key Words: Spinal cord injury, free oxygen radicals, antioxidants

Oksijen radikali oluşumu ve lipid peroksidasyonun post-travmatik spinal kord dejenerasyonu ve patofizyolojisinde önemli role sahip olduğu ileri sürülmektedir. Oksijen radikali oluşumu ve lipid peroksidasyon santral sinir sistemi travmasını takiben gerçekleşen erken biyokimyasal olaylardır (1,2,3,4,5,6,7).

Son yıllarda giderek artan deneysel kanıtlar santral sinir sistemi yaralanmalarında post-travmatik hipoperfüzyon, ödem, aksonal iletim yetersizliği ve anterograd dejenerasyon gibi patofizyolojik olaylarda serbest radikal reaksiyonlarının ve özellikle lipid peroksidasyonun önemine işaret etmektedir. Gerçekten de santral sinir sisteminde deneysel olarak oluşturulan mekanik yaralanma ile kimyasal peroksidatif yaralanmanın büyük benzerlik göstermesi, serbest radikalleri temizleyen veya lipid peroksidas-

yonu inhibe eden bileşiklerin uygulanmasıyla post-travmatik patofizyolojik değişikliklerin bloke edilebilmesi ve fonksiyonel düzelmenin hızlanması bu teoriyi güçlendirmektedir (1,2,5,6,7). NASCIS II (second National Acute Spinal Cord Injury Study) nin klinik sonuçları spinal ilik yaralanmasından sonra 8 saat içinde kuvvetli antioksidan etkili metilprednizolon uygulanmasının kronik nörolojik düzelmeyi önemli derecede artırdığını göstermektedir (8). Ancak, insanda daha selektif ve daha etkin antioksidan bileşiklerle çalışmalar halen sürdürülmektedir.

Oksijen radikali reaksiyonu süreçlerinin işe karıştığı patolojilerde oksidatif mekanizmanın katkısının irdelenmesinde önemli kriterlerden biri de endojen antioksidanların aktivite düzeylerinin saptanmasıdır. Nitekim çeşitli antioksidanların doku seviyeleri spinal travmayı takiben yaralanma şiddeti ile

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

** Sağlık Bakanlığı Ankara Rehabilitasyon Merkezi

orantılı olarak azalmaktadır. Bu durum α -tokoferol (Vit E), askorbik asit (Vit C) ve ubiquinol için gösterilmiş durumdadır (9).

Yaralanmış sinir sisteminde başlangıçta oluşan primer oksijen radikali süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) tir. $O_2^{\cdot-}$, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. H_2O_2 ise katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından detoksifiye edilir. Literatürde spinal kord yaralanmalarında bu hücre içi antioksidan enzim aktivitelerini inceleyen tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada Liao ve ark. (10) paraplejik hastalarda yalnızca kan Cu,ZnSOD aktivitesini incelemişler ve düşük bulmuşlardır. Dolayısı ile konu bu yönüyle tamamen araştırmaya açık durumdadır. Sunulan çalışmada travmatik spinal lezyonlu paraplejik olgularda intrasellüler antioksidan enzim aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmış ve organizmanın genel antioksidan savunma kapasitesini yansıtması nedeniyle eritrosit SOD ve CAT aktiviteleri incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Çalışmaya Sağlık Bakanlığı Ankara Rehabilitasyon Merkezinde tedavi altında olan ve çeşitli düzeylerde (T_1-L_1) travmatik spinal kord lezyonu bulunan, 16-42 yaşları arasında (ortalama 29) ve posttravmatik ortalama 6 ay içindeki (3-12 ay) 20 si erkek 13 ü kadın 33 paraplejik hasta alındı. Aynı yaş grubundan (ortalama 30) erkek (10) ve kadın (10) toplam 20 sağlıklı birey kontrol grubu olarak incelendi.

Hasta ve kontrol grubu solunum fonksiyonları (Zorlu Vital Kapasite-FVC ve FEV_1/FVC) açısından değerlendirildi. Her iki grupta eritrosit SOD ve CAT aktiviteleri ile eritrosit SOD'u aktivitesi bakıra, stabilitesi çinkoya bağlı bir metaloenzim (Cu, ZnSOD) olduğundan plazma bakır ve çinko düzeyleri de incelendi.

Hastaların paraplejik olmaları nedeni ile solunum fonksiyon testleri oturur pozisyonda gerçekleştirildiğinden, erkek ve kadın hastalarda saptanan FVC ve FEV_1/FVC değerleri erkek ve kadın sağlıklı bireylerden yine aynı pozisyonda elde edilen verilerle karşılaştırılarak değerlendirildi.

Eritrosit SOD ve CAT enzim aktivitelerinin saptanması için her iki gruptan alınan heparinize venöz kan örnekleri santrifüje edilerek plazmaları ayrıldıktan sonra, eritrositler iki kez salinle yıkandı ve 1.5 hacim distile su eklenerek hemolize edildi. Daha sonra hemolizatlardan etanol-kloroform ekstratları

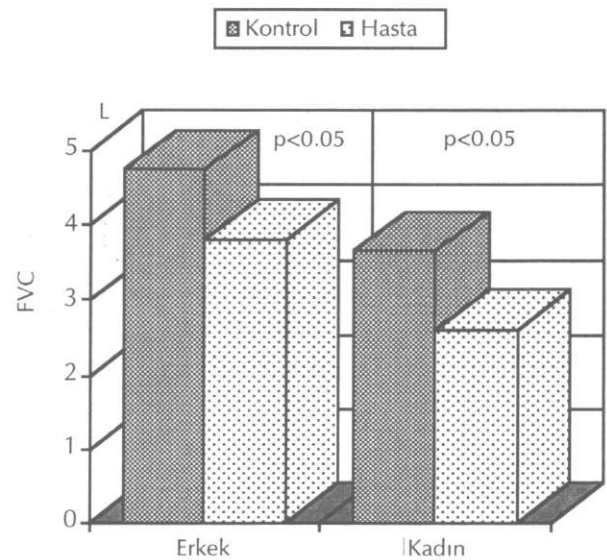
hazırlanarak; enzim aktiviteleri ve ayrılmış plazma örneklerindeki bakır, çinko düzeyleri metodlarına uygun şekilde spektrofotometrik olarak saptandı (11,12,13).

Solunum fonksiyon testleri Vitalograph marka spirometre, enzim aktiviteleri tayini Beckman (Model 26) spektrofotometresi, plazma bakır ve çinko düzeyi ölçümleri ise Hitachi (180-70) atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Bulgular iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ile karşılaştırıldı ve değerlendirildi.

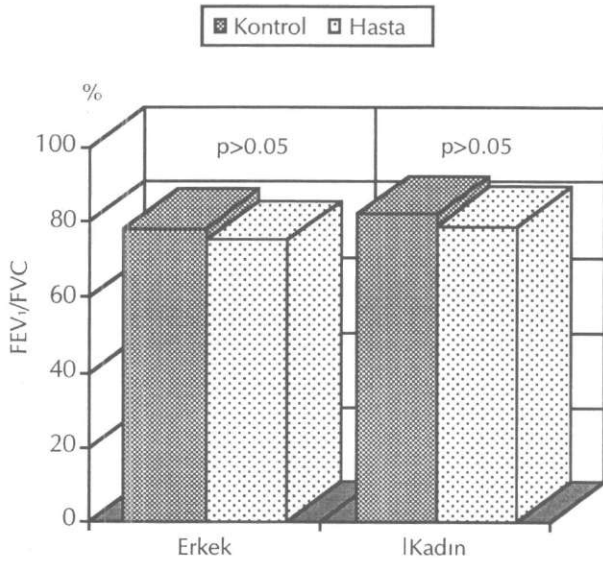
BULGULAR

Çalışmaya alınan erkek hastalarda FVC değerleri (ortalama 3.80 ± 0.99 L) sağlıklı erkek bireylere göre (ortalama 4.73 ± 0.69 L) ve kadın hastalarda (ortalama 2.56 ± 1.15 L) sağlıklı kadın bireylere göre (ortalama 3.57 ± 0.44 L) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 1). FEV_1/FVC oranları ($\%FEV_1$) ise; erkek hastalarda ortalama 74.4 ± 14.5 , sağlıklı erkek bireylerde ortalama 78.6 ± 6.2 ve kadın hastalarda ortalama 79.1 ± 5.8 , sağlıklı kadın bireylerde ortalama 82.0 ± 4.9 olarak saptandı. Hasta ve kontrol grupları arasında FEV_1/FVC değerleri bakımından önemli bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 2).

Çalışmamızda eritrosit SOD ve CAT enzim aktiviteleri spinal lezyonlu olgularda kontrol grubuna



Şekil 1: Kontrol grubu ve travmatik spinal lezyonlu hastalarda ortalama FVC değerleri



Şekil 2: Kontrol grubu ve travmatik spinal lezyonlu hastalarda ortalama FEV₁/FVC değerleri

Tablo 1: Kontrol grubu ve travmatik spinal lezyonlu hastalarda eritrosit SOD, katalaz enzim aktiviteleri ve plazma bakır, çinko değerleri (ortalama ± SD)

	Kontrol Grubu (n=20)	Hasta Grubu (n=33)
Eritrosit SOD (U/grHb)	3309 ± 291	2236 ± 504***
Eritrosit CAT (k/grHb)	300 ± 49	161 ± 49***
Plazma BAKIR (%µg)	78.7 ± 16.7	97.8 ± 34.4*
Plazma ÇİNKO (%µg)	71.3 ± 12.4	60.1 ± 14.9**

* p değeri < 0.05, ** p değeri < 0.01, *** p değeri < 0.001

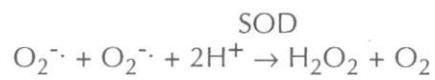
göre önemli derecede düşük bulundu (p<0.001). Plazma bakır düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek (p<0.05), plazma çinko düzeyi ise düşük (p<0.01) bulundu (Tablo-1).

TARTIŞMA

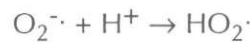
Çalışmamızda travmatik spinal lezyonlu paraplejik hastalarda FVC, eritrosit SOD ve CAT enzim aktiviteleri ile plazma çinko konsantrasyonunun sağlıklı bireylere göre önemli derecede düşük, plazma bakır konsantrasyonunun anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.

Spinal lezyonlularda, solunum fonksiyonlarının en önemli göstergesi olabilen vital kapasitenin (14) düşük olduğu birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir. Solunum fonksiyonları etkilenmiş spinal lezyonlu olgularda FVC değeri lezyon seviyesi ile ilgili bir azalma göstermekte, lezyon seviyesi yükseldikçe solunumsal bozukluk şiddetlenmektedir (15,16,17). Ayrıca, çalışmamızda da saptandığı gibi bu hastalarda FVC düşüklüğünün yansıttığı şekilde maksimum inspirasyon kısıtlılığı ile birlikte genellikle normal veya normale yakın bir FEV₁/FVC oranı bulunmaktadır (16,18).

Çalışmamızda spinal lezyonlu hastalarda eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin normal sağlıklı bireylere göre önemli derecede düşük oluşu bu hastalarda serbest radikallere karşı endojen savunma kapasitesinin azalmış olduğunu ve şiddetli bir oksidan stresin varlığını yansıtmaktadır. Çünkü süperoksit ve hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sağlıklı bireydekinden çok daha azdır. Oysa kronik hipoventilasyon yanında, yaralanmış santral sinir sisteminde pek çok kaynaktan süperoksit radikali üretiminin arttığı belirlenmiş durumdadır (1,2,7). Yaralanma ile aktive olan kaynaklardan bazıları arakidonik asit kaskadı (prostaglandin sentetaz ve 5-lipoksijenaz aktiviteleri), katekolamin oksidasyonu, mitokondrial kaçak, ekstrasvazyona uğramış hemoglobinin oksidasyonu, makrofaj ve nötrofil aktivasyonu ve infiltrasyonudur. Oluşan süperoksit radikalleri SOD tarafından hızlandırılan bir dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksite dönüştürülür.



Diğer taraftan solüsyon halinde iken ve SOD aktivitesi yetersizliğinde süperoksitin büyük kısmı hızla hidroperoksil radikaline (HO₂·) dönüşür.



Süperoksit ve hidroperoksil relatif konsantrasyonları ortamdaki H⁺ konsantrasyonu üzerine dayanır. Ciddi olarak yaralanmış sinir sisteminde H⁺ konsantrasyonu ve dolayısı ile HO₂· konsantrasyonu artar (1,2).

Hidroperoksil radikalinin lipitte eriyebilirliği süperoksite göre daha fazladır ve daha kuvvetli bir oksidandır. Ayrıca hidroperoksil radikali asidik pH da süperoksite göre 10⁸ kat daha hızlı olarak H₂O₂ e dönüşür (2,19).

Sonuç olarak spinal yaralanmanın yol açtığı çeşitli biyokimyasal ve inflamatuvar reaksiyonlar sonucu oluşumu önemli derecede artan süperoksit, asidik ortamda daha reaktif bir radikal olan hidropereksile çevrilir. $HO_2\cdot$ nin dismutasyon hızı yüksek olduğu için H_2O_2 oluşumu da büyük oranda artar. CAT aktivitesi yetersiz olduğu için de H_2O_2 yeterli derecede detoksifiye edilemez.

Öte yandan, yaralanmanın yol açtığı asidik pH da ve $O_2\cdot^-$ etkisiyle transferrin ve ferritinden bir kısım demir serbestleşir (20). Demir serbestleşince oksijen radikali reaksiyonlarını etkin bir şekilde katalize eder ve en reaktif ürün olan hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşumuna yol açar. Ayrıca mekanik travmanın yol açabileceği hemoraji de kesin bir hemoglobin kaynağıdır. Serbest hemoglobin oksijen radikali reaksiyonlarını stimüle edebilir (21). Ek olarak H_2O_2 ve serbest radikal reaksiyonları ile oluşan lipid peroksitler hemoglobinden demiri serbestleştirirler. Yaralanmış sinir sisteminde bir diğer $\cdot OH$ kaynağı daha vardır. Endotel hücreleri, nötrofiller, makrofajlar ve mikroglialar nitrik oksit sentaz aracılığı ile $O_2\cdot^-$ ve nitrik oksit ($\cdot NO$) üretebilirler. Bu iki ürünün birleşerek oluşturdukları peroksinitrit ($ONOO\cdot$) protonasyona uğrar ($ONOOH$) ve hemen sonra hidroksil radikali ve nitronium anyonuna ($\cdot NO_2$) ayrışır (22).

Hidroksil radikalının organizmada doğal temizleyicisi yoktur. Oluşumu normalde $O_2\cdot^-$ ve H_2O_2 in detoksifikasyonu ile önlenir. Üretimleri aşırı derecede artan, buna karşın yeterli düzeylerde detoksifiye edilemeyen radikaller hem yaralanma bölgesinde, hem de organizmanın diğer kesimlerinde bir çok olayı tetiklerler. Oluştukları bölgelerde başta memb-

ran lipidleri olmak üzere lipid peroksidasyonu, protein denaturasyonu ve DNA harabiyetine yol açabilirler. Membranlarda Na^+-K^+ ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz' ı inhibe ederek hücre içi ve dışı iyonik dengenin bozulmasına ve ödeme yol açarlar (23,24). Hücre içinde Ca^{+2} konsantrasyonu hızla artarak hücreyi ölüme kadar götürebilen süreçleri tetikleyebilir. Serbest oksijen radikalleri antioksidan enzimleri de inhibe ederler (25). Böylece oksidan stres şiddetlenir.

Serbest radikaller makrofajları ve nötrofilleri aktive ederek nötrofil infiltrasyonuna yol açarlar (26). Aktif makrofajlardan salınan inflamatuvar mediatörlerle olay amplifiye olur. Diğer taraftan hem travma stresi ve oksidan stres, hem de makrofajlardan salınan interleukin-1 (IL-1) karaciğeri stimüle ederek seruloplazmin sentez ve salınımını artırır (27). Süperoksit radikali konsantrasyonu artışı da, önemli bir ekstrasellüler antioksidan olan seruloplazminin sentezini stimüle eder. Böylece plazma seruloplazmin ve Cu konsantrasyonu artar. IL-1 ve şiddetli stresler karaciğer tarafından çinko tutulmasına da yol açarlar. Çalışmamızda spinal lezyonlu paraplejik hastalarda saptanan yüksek plazma bakır konsantrasyonu ve düşük çinko konsantrasyonu bu mekanizmanın sonucu olarak değerlendirilebilir.

Araştırma spinal lezyonlu paraplejik hastalarda GPx aktivitesinin incelenmesi yönünde devam etmekle birlikte, çalışmamızın mevcut bulguları bu hastalarda antioksidan tedavinin özellikle intrasellüler antioksidan desteğin mutlaka uygulanması gerektiği konusunda önemli ip uçları getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Faden AI: Experimental neurobiology of central nervous system trauma. Crit Rev Neurobiol 7 (3-4): 175-86, 1993.
2. Hall ED, Braughler JM: Free radicals in CNS injury. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 71: 81-105, 1993.
3. Barut S ve ark.: Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. Neurosurg Rev 16 (1): 53-9, 1993.
4. Ikata T ve ark.: Clinical considerations and biochemical basis of prognosis of cervical spinal cord injury. Spine 14 (10): 1096-101, 1989.
5. Hall ED: Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. Ann Emerg Med 22 (6): 1022-7, 1993.
6. Faden AI, Salzman S: Pharmacological strategies in CNS trauma. Trends Pharmacol Sci 13 (1): 29-35, 1992.
7. Ikeda Y, Long DM: The molecular basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 27 (1): 1-11, 1990.
8. Bracken MB ve ark.: A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. N Engl J Med 322: 1405-11, 1990.
9. Lemke M ve ark.: Decreases in tissue levels of ubiquinol-9 and -10, ascorbate and alpha-tocopherol following spinal cord impact trauma in rats. Neurosci Lett 108 (1-2): 201-6, 1990.
10. Liao W ve ark.: Impaired blood superoxide dismutase in the traumatic paraplegic patients. Acta Neurol Scand 86 (3): 329-31, 1992.

11. Aebi H.: Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* Vol.105, 1984, Academic Press, New York, sayfa:121-6
12. Winterbourn CC ve ark.: The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85:337-41, 1975.
13. Jacob RA: Trace elements. In *Textbook of clinical chemistry*, edited by Tietz NW, 1986, WB Saunders Company, sayfa: 965-96
14. Roth EJ ve ark.: Pulmonary function testing in spinal cord injury: correlation with vital capacity. *Paraplegia* 33 (8): 454-7, 1995.
15. Chen CF, Lien IN, Wu MC: Respiratory function in patients with spinal cord injuries; effects of posture. *Paraplegia* 28: 81-86, 1990.
16. Fugl-Meyer AR: Effects of respiratory muscle paralysis in tetraplegic and paraplegic patients. *Scand J Rehabil Med* 3: 141-150, 1973.
17. Bluehardt MH ve ark.: Repeated measurements of pulmonary function following spinal cord injury. *Paraplegia* 30 (11): 768-74, 1992.
18. Haas F ve ark.: Temporal pulmonary function changes in cervical cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 66 (3): 139-44, 1985.
19. Halliwell B, Gutteridge JMC: The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. In *Methods in Enzymology* Vol.186, 1990, Academic Press, New York, sayfa: 1-85
20. Gutteridge JMC: Antioxidant properties of proteins ceruloplasmine, albumin and transferrin: a study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 869: 119-27, 1986.
21. Sadrzadeh SM ve ark.: Hemoglobin, a biological Fenton reagent. *J Biol Chem* 259: 14354-6, 1984.
22. Radi R ve ark.: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-7, 1991.
23. Weiss SJ: Oxygen, ischemia, and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl.*548: 9-37, 1986.
24. Faden AI, Chan PH, Longar S: Alterations in lipid metabolism, (Na⁺, K⁺)-ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem* 48: 1809, 1987.
25. Sinet PM, Garber P: Inactivation of the human copper-zinc superoxide dismutase during exposure to superoxide radical and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 212: 411, 1981.
26. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.*548: 47-63, 1986.
27. Cousins RJ: Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65: 238-308, 1985.