

İskemik İnme Hastalarında Serum Malondialdehid ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesi

Serum Malondialdehyde and Paraoxanase Enzyme Activity in Patients with Ischemic Stroke

Aynur Kırbuş*

Serkan Kırbuş**

Ömer Anlar**

Hasan Efe*

Adnan Yılmaz*

Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi, Rize

*Tıbbi Biyokimya, **Nöroloji

ÖZET

Amaç: İnme, dünyanın her yerinde, özellikle de yaşlılarda mortalite ve morbiditenin önde gelen sebeplerinden biridir. Oksidatif stresin iskemik inme fizyopatolojisinde önemli bir yeri vardır. Oksidatif stresin önemli parametresi olan Malondialdehid (MDA) lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir. Paraoksonaz (PON1) karaciğerde sentezlenip kana sekrete edilmektedir ve kanda yüksek dansiteli lipoproteinle (HDL) ilişki içindedir. PON1 ateroskleroz gelişimine karşı koruyarak lipid metabolizmasında önemli bir fizyolojik rol oynayabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, oksidatif stresin endeksleri olarak MDA konsantrasyonlarını değerlendirmek suretiyle, iskemik inmede oksidatif stres ile PON1 arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız Rize Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji kliniğinde akut iskemik inme nedeniyle yatırılarak takip ve tedavi edilen 72 hasta ile özgeçmişinde inme ve sistemik hastalığı olmayan 72 kontrol ele alınarak yapıldı. Hasta ve kontrol grubuna ait serum malondialdehid ve paraoksonaz enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bulgular: Kontrol grubuna kıyasla iskemik inmeli hastalarda serum MDA seviyeleri yükseldi ve PON1'in antioksidan aktivitesi düştü ($p<0.05$).

Sonuç: Bu bulgular, iskemik inme fizyopatolojisinde oksidan ve antioksidan mekanizmaların süreçteki önemine işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: İnme, oksidatif stres, malondialdehid, paraoksonaz

ABSTRACT

Objective: Stroke, in all over the world, the one of the leading causes of morbidity and mortality especially in the geriatric population. Oxidative stress has an important role in pathophysiology of ischemic stroke. Malondialdehyde (MDA) is an important parameter of oxidative stress is a good indicator of lipid peroxidation. Paraoxanase (PON1) is synthesized in the liver and secreted in the blood, where it associates with high-density lipoprotein. PON1 might play an important physiological role in lipid metabolism through protecting against the development of atherosclerosis. The purpose

of this study, by evaluating the concentration of MDA as indices of oxidative stress, to investigate the relationship between PON1 with oxidative stress in ischemic stroke.

Materials and Methods: Total of 72 patients with acute ischemic stroke, admitted and treated in Neurology Clinic in Rize Education and Training Hospital and 72 control, had no stroke or any systemic disorder have been included. Malonyldialdehyde (MDA) and paraoxonase (PON) enzyme activities have been determined using spectrophotometric method, in both patient and controls.

Results: Compared with the control group, serum MDA levels were higher in patients with ischemic stroke and lower antioxidant activity of PON1 ($p < 0.05$).

Conclusion: These findings show that oxidant and antioxidant mechanisms are important in pathophysiology of ischemic stroke's process.

Key Words: Stroke, oxidative stress, malondialdehyde, paraoxonase

GİRİŞ

İnme, gelişmiş ülkelerde erişkinlerdeki mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleri arasında yer alan kompleks multifaktöryel bir bozukluktur. Genel popülasyonda yapılan çalışmalarda tüm inmelerin %70-80'ni iskemiktir (1). İnmenin fizyopatolojisinde oksidatif stresin önemli bir rolü olup serbest oksijen radikallerin üretimini indükleyerek iskemik inme için bağımsız bir risk faktörü oluşturmaktadır (2). Oksidatif stres muhtemelen lipid peroksidasyonundan ötürü iskemi ve reperfüzyonun indüklediği nöronal hasar sürecinde rol oynayan mekanizmalardan biridir (3). Bir oksidatif hasar endeksi olarak yaygın kullanılmakta olan malondialdehid (MDA), lipoproteinlerle etkileşime girme kabiliyetinden dolayı, farmakolojik çalışmalarda üzerinde özellikle ve dikkatle durulan bir molekül olmuştur.

Paraoxonase gen ailesi, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda lokalize olan ve birbirine komşu PON1, PON2 ve PON3 adlı genleri içermektedir. Bu insan PON genlerinin amino asitlerinin yaklaşık %60'ı, nükleotidlerinin ise yaklaşık %70'i aynıdır. Bununla birlikte diğer memeli türlerinde bu üç genin herbirinin amino asit düzeylerinin %79-80'i, nükleotidlerinin ise %81-90'ı ortaktır (4). PON1 karaciğerde sentezlenip kana sekrete edilmektedir ve kanda yüksek dansiteli lipoproteinle (HDL) ilişki içindedir. HDL boyut ve şeklindeki değişiklikler PON1 bağlama afinitesi ve stabilitesini ciddi olarak etkile-

mektedir ve bu durum antioksidatif kapasitede azalmayla sonuçlanmaktadır (5). PON1 ateroskleroz gelişimine karşı koruyarak lipid metabolizmasında önemli bir fizyolojik rol oynayabilmektedir. Birçok araştırma PON1'ın ateroskleroza karşı koruyucu etkisinin olduğu hakkında önemli deliller sağlamıştır (4-7). Son zamanlarda PON1'in yapısında veya serum seviyesindeki değişikliklerin serebrovasküleri hastalıklar için bir risk faktörü olabileceği bildirilmektedir (4). PON ile MDA arasında bir ilişki varsayımı yapılabildiğinden dolayı, bu çalışmanın amacı, oksidatif stresin endeksleri olarak MDA konsantrasyonlarını değerlendirmek suretiyle, iskemik inmeli hastalarda oksidatif stres ile PON arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Rize Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniğinde akut iskemik inme nedeniyle yatırılarak takip ve tedavi edilen 72 hasta ile özgeçmişinde inme ve sistemik hastalığı olmayan 72 kontrol ele alınarak yapıldı. Hastaların anamnezleri alındıktan sonra fizik ve nörolojik muayeneleri, rutin biyokimyasal tetkikleri, karotis-vertebral doppler USG, transtorasik ve/veya transözafagial ekokardiyografi ve nörogörüntülemeleri (Beyin BT ve/veya Beyin MRG) yapılarak elde edilen veriler ışığında TOAST ("Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment") sınıflamasına göre gruplara ayrıldı. Çalışmaya katılan herkese bilgilendirilmiş hasta onam formu okutulup imzalandıktan sonra etik kuruldan onay alındı.

Tüm hastaların yatışlarının ilk 24 saati içerisinde henüz beslenilmeye başlanılmadan rutin tetkikler yanında farklı tüplere venöz kan örnekleri alındı. Alınan bu kan örneklerinden bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ile antioksidan bir enzim olan serum PON1 aktivitesi çalışıldı.

Malondialdehid Ölçümü

Hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların plazma MDA seviyesi Draper ve Hadleyin metoduna göre çalışıldı (8). Bu metoda göre lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli karışımın şiddetinin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Beckmann Coulter) olarak ölçülmesi esas alındı. Sonuçlar nmol MDA/ml olarak verildi.

Serum PON1 Analizi

Hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların serum PON1 aktivitesi, substrat olarak kullanılan paraoksonun (O,O-diethyl-O-P-nitrophenylphosphate; Sigma, Chemicals.), enzimatik olarak hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün verdiği renkli ürünün absorbanasının spektrofotometrik (Beckmann Coulter) olarak ölçümü ile belirlendi (9). Sonuçlar U/ml olarak ifade edildi. (Paraoksonaz aktivitesi için 1 ml serumdaki enzimin 1 nmol paraoksonu 1 dakikada 4-nitrofenole dönüştüren enzim aktivitesi Ünite olarak tanımlanmıştır).

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler "SPSS for Windows versiyon 11.0" paket program ile yapıldı. Hastalar ile kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar, gruplar homojen dağılım gösterdiğinde bağımsız Student t testi ile homojen dağılım göstermediğinde Mann Whitney-U testi

ile bakıldı. Parametreler arasındaki korelasyon Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. p değeri <0.05 olan veriler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 72 hastanın yaş ortalaması 62.4 (34-86) olup bunların 43'ü erkek (%59.7), 29'u kadın (%40.2) dı. Kontrol grubunun ise yaş ortalaması 62.2 (32-84) olup 41'i erkek (%56.9), 31'i kadın (%43.1) dı. Yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel anlamlılık yoktu (p>0.05). TOAST sınıflamasına göre alt gruplara ayırdığımız hastalarımızın 22'si (%30.5) büyük arter ateroskleroza, 25'i (%34.7) küçük arter oklüzyonu (lakün), 19'u (%26.3) kardiyoemboli, 2'si (%0.2) diğer bilinen nedenlere bağlı inmeler, 4'ü (%0.5) nedeni belirlenemeyen inmeler sınıfına girmiştir. Kontrol grubuna kıyasla akut iskemik inmeli hastalarda MDA seviyeleri yüksekti ve PON'un antioksidan aktivitesi düşüktü. Ayrıca inme alt tipleri arasında serum MDA seviyesi yüksekliği ve PON aktivitesi düşüklüğü ayrı ayrı değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlılık yoktu. Hasta ve kontrollere ait demografik bilgiler Tablo 1'de, serum MDA ve PON1 aktivitesi ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik özellikler.

Özellikler	Hasta (n=72)	Kontrol (n=72)
Yaş (yıl)	62.4 (34-86)	62.2 (32-84)
Erkek / Kadın	43 / 29	41 / 31
Büyük Arter Ateroskleroza	22 (%30.5)	-
Küçük Arter Oklüzyonu	25 (%34.7)	-
Kardiyoembolik	19 (%26.3)	-
Diğer Bilinen Nedenler	2 (%0.2)	-
Nedeni Belirlenemeyenler	4 (%0.5)	-

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubuna ait serum MDA ve PON aktivite değerleri.

Özellikler	Hastalar (n=72) Ortalama ± SD	Kontrol (n=72) Ortalama ± SD	p-Değeri
MDA (nmol/ml)*	6.6 ± 0.2	3.7 ± 1.6	P<0.001
PON (U/ml)**	143.9 ± 0.5	156.2 ± 4.8	P<0.001

* MDA-Malondialdehid, ** PON-Paraoksonaz

TARTIŞMA

Lipid peroksidasyonu, insanlarda iyi bilinen ve kanıtlanmış bir hücre hasarı mekanizmasıdır (2). Bu nedenle hücreler ve dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. İnmenin fizyopatolojisinde serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun etkisi vardır. Gerek deneysel gerekse klinik çalışmalar inme sonrası görülen beyin hasarında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (3). Lipid peroksidatlarının artan seviyesinin sebebinin, iskeminin, kandaki veya nöronlardaki lipidlerde oksidasyona yol açmış olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan ortaya çıkan oksidasyon nöronlardaki nükleik asitleri, pürin, pürimidin veya nükleozid bazlarına metabolize edebilir ve bu da adenosin fazlalığına yol açmış olabilir. Artan adenosin fazlalığı, serbest radikallerin üretiminde önem taşıyan ksantin oksidaz yolları için bir substrat haline dönüşür (3). Dolayısıyla oksidatif stres, ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşümüne yol açan fosfolipazları ya da serbest radikallerin üretimine sebep olan protein kinazlarını aktive eder ve harekete geçirir (2-3). Bu durum bir kısır döngü oluşturabilir. Lipid peroksidasyonunun iskemik inmede oynadığı rol, kontrol deneklerine kıyasla iskemik inmeli hastalarımızda gözlemlenen MDA konsantrasyonunun istatistiksel açıdan önemli düzeyde daha yüksek olmasıyla da teyit edilmiştir. Sarkar ve ark. iskemik inmeli hastaların serumlarında LDL oksidasyonu ile MDA arasında anlamlı ilişkiden bahsetmişlerdir (10). Yine son zamanlarda iskemik inme sonrası ortaya çıkan oksidatif stresin, pro-oksidan enzim olarak bilinen NADPH oksidazı aktif hale getirerek nöronal hücre ölümünde katkıda bulunduğu da gösterilmiştir. Hatta NADPH oksidaz inhibitörlerinin nöroprotektif etkiyle inmenin primer veya sekonder korunmasında kullanımını gündeme getirmiştir (7).

İskemik inmede serbest oksijen radikallerinin etkisinin iyi bilinmesine karşın antioksidan mekanizmaların süreçteki rolleri henüz netlik

kazanmamıştır (7). Bir antioksidan enzim olan PON1, HDL ve düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu inhibe ederek HDL fonksiyonunu korumakta, makrofajlardan selüler kolesterol salınımını azaltarak okside olmuş LDL etkilerini azaltmakta ve aterosklerotik lezyonlardaki lipid peroksidat düzeylerini düşürmektedir (4). PON1 kodlama bölgesinde 2 polimorfizm bulunmaktadır: Pozisyon 55'deki lösin/metionin (M55L) ve pozisyon 192'deki glutamin/arjinin (Q192R). PON1'in LDL oksidasyonunu inhibe etme kapasitesi nedeniyle birçok çalışma PON polimorfizmleri ve genetik yatkınlığın koroner arter hastalığı ile olan ilişkisini değerlendirmek üzere planlanmıştır (4). Daha sonra serum PON aktivitesindeki değişiklikler ile inme, tip 2 diyabetes mellitus, Parkinson hastalığı, familial hiperkolesterolemi, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ve postmenapozal kadınlarda kemik kütlesi azalması gibi bir dizi patofizyolojik durumla ilişkilendirilmiştir (4-6). Özellikle iskemik inmeli hastalarda, yaş ve cinsiyet açısından neredeyse eşleştirilmiş kontrol grubuna göre, istatistiksel açıdan önemli oranda daha düşük PON aktiviteleri rapor edilmiştir. Nitekim Kim NS ve ark. Koreli iskemik inmeli hastaların kanlarında kontrol grubuna kıyasla azalmış serum PON1 aktivitesi tesbit ederek azalan PON aktivitesinin iskemik inme için bir risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir (11). Ülkemizden Can Demirdöğen ve ark. iskemik inmeli hastalarda yapmış olduğu çalışmada azalan PON1 aktivitesine, PON1 polimorfizmin eşlik etmesinin, inme için önemli bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (12). Dolayısıyla serum PON aktivitesi, antiaterojenik kapasiteyi yansıtabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmamızda iskemik inmeli hastalarda istatistiksel açıdan önemli oranda düşük serum PON aktivitesi ve artmış MDA seviyeleri tespit ettik. Böylece yapılan diğer çalışmalarla birlikte iskemik inmenin, oksidatif stres ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki bir dengesizlikle bağlantılı olduğunu vurgulamak istedik. Ayrıca klinis-

yenlerin iskemik inmeli hastaların erken tanı, takip ve tedavilerini yürütürken bu bulguları göz önünde bulundurmalarının yararlı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Xian Y, Holloway RG, Chan PS, Noyes K, Shah MN, Ting HH, et al. Association Between Stroke Center Hospitalization for Acute Ischemic Stroke and Mortality. JAMA 2011; 305(4): 373-80.
2. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Nanetti L, Mazzanti L, Silvestrini M, et al. Lipid Peroxidation in Stroke Patient. Clin Chem Lab Med 2008; 46 (1): 113-7.
3. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H et al. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. Antioxid Redox Signal 2011; 14(8): 1505-17.
4. Lazaros L, Markoula S, Kyritsis A, Georgiou I. Paraoxonase Gene Polymorphisms and Stroke Severity. Eur J Neurol 2010; 17(5): 757-9.
5. Liu JL, Li JP, Wang XL, Yang Y. Relationship between Q192R Polymorphisms in Paraoxonase 1 Gene and Young Ischemic. Stroke 2010; 90(13): 912-6.
6. Shin BS, Oh SY, Kim YS, Kim KW. The Paraoxonase Gene Polymorphism in Stroke Patients and Lipid Profile. Acta Neurol Scand 2008; 117(4): 237-43.
7. Parizadeh MR, Azarpazhooh MR, Mobarra N, Nematy M, Alamdari DH, Tavalae S, et al. Prooxidant-Antioxidant Balance in Stroke Patients and 6-month Prognosis. Clin Lab 2011; 57(3-4): 183-91.

İskemik İnmede Malondialdehid ve Paraoksonaz Aktivitesi

8. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 1990; 186: 421-31.
9. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase I activity in rats. J Nutr 2000; 130: 2427-33.
10. Sarkar PD, Rautaray SS. Oxidized LDL and Paraoxonase Status in Ischemic Stroke Patients. Indian J Physiol Pharmacol 2008; 52(4): 403-7.
11. Kim NS, Kang K, Cha MH, Kang BJ, Moon J, Kang BK, et al. Decreased Paraoxonase-I Activity is a Risk Factor Ischemic Stroke in Koreans. Biochem Biophys Res Commun 2007; 364(1): 157-62.
12. Can Demirdögen B, Türkanoglu A, Bek S, Sanisoğlu Y, Demirkaya S, Vural O, et al. Paraoxonase/ arylesterase ratio, PON1 192Q/R Polymorphism and PON1 Status are Associated with Increased Risk of Ischemic Stroke. Clin Biochem 2008; 41(1-2): 1-9.

Yazışma adresi:

Dr. Aynur Kırbas
Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya, Rize
Tel : 0 464 212 30 00 - 0 464 212 30 15
E-posta: aynur.kirbas@rize.edu.tr
