

Geçici Serebral İskemide Antioksidan Savunma Sistemindeki Değişiklikler

E ve C Vitaminlerinin Koruyucu Etkisi

Basra Obay Deniz*, Abdurrahman Şermet*, Cemil Tümer*, Yüksel Koçyiğit*,
Nebahat Taşdemir**, Mukadder Atmaca*, Mustafa Kelle*

ÖZET

Geçici ön beyin iskemisinin antioksidan savunma sisteminde zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve iskemi öncesi C ve E vitaminleri uygulamasının etkileri araştırıldı. Bu çalışma, vücut ağırlıkları 300-400 g. arasında değişen 140 erkek Wistar Albino sıçanda gerçekleştirildi. Deney gruplarına serebral iskemiden bir hafta önce 10 mg/kg/gün E vitamini (α -tokoferol) ve 30 mg/kg/gün C vitamini birlikte veya ayrı ayrı intraperitoneal olarak uygulandı. Otuz dakikalık iskemiden 24 ve 72 saat sonra öldürülen hayvanların beyinleri hızla çıkartıldı. Serebral ödem miktarı, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile nonenzimatik antioksidanlardan redükte vitamin C ve E düzeyleri belirlendi. Ayrıca, lipid peroksidasyon göstergesi olarak malondialdehit (MDA) miktarı ölçüldü. İskemi sonrası 24. saatte enzimatik antioksidanlardan SOD ve CAT aktiviteleri ile nonenzimatik antioksidanlardan redükte vitamin C ve E düzeyleri iskemik beyin bölgesinde önemli ölçüde azaldı (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.01$). Reperfüzyonun 72. saatinde SOD ve CAT aktiviteleri artarak iskemi öncesi değerleri aştı (sırasıyla; $p<0.01$ ve $p<0.05$). İskemi sonrası 24. saatte azalan redükte vitamin C ve E düzeyleri iskemi sonrası 72 saatte yükselmiş olduğu halde kontrol değerlere ulaşamadı (sırasıyla; $p<0.01$ ve $p<0.01$). İskemiden bir hafta önce C ve E vitamini uygulanması, reperfüzyonun 24. saatinde SOD ve CAT aktivitelerindeki azalmayı önledi (sırasıyla; $p<0.01$ ve $p<0.01$). Vitamin uygulanan gruplarda iskemiyeye bağlı lipid peroksidasyon artışı ve serebral ödem miktarı önemli ölçüde azaldı (sırasıyla; $p<0.01$ ve $p<0.01$). İskemiden 24 saat sonra redükte vitamin C ve E düzeyleri, SOD ve CAT aktiviteleri ile serebral ödem ve lipid peroksidasyon miktarları arasında negatif ilişkiler saptandı. Otuz dakikalık geçici serebral iskemi, antioksidan savunma sisteminde değişiklikler oluşturmakta ve bu değişiklikler, iskemi öncesi E ve C vitaminleri uygulanmasıyla önemli ölçüde azaltılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Serebral İskemi, Antioksidan Savunma Sistemi, Lipit Peroksidasyonu



The Changes in Status of Antioxidant Defence System on Temporary Cerebral Ischemia and the Protective Effect of Vitamin E and C

SUMMARY

Time-dependent changes in antioxidant defence system and the effect of vitamin C and E supplementation on temporary cerebral ischemia was investigated in this study. This study was performed in 140 male Wistar albino rats weighting 300-400g. Before 30 minutes cerebral ischemia vitamin E (α -tocopherol) 10 mg/kg/day and vitamin C 30 mg/kg/day were applied intraperitoneally for a week period. Animals were sacrificed following 24 h and 72 h ischemia and the brain was removed as quick as possible. Brain water content, süperoxide dismutase (SOD)) and catalase (CAT) activities and the level of nonenzymatic antioxidant, reduced vitamin C and α -tocopherol levels were measured. Moreover the level of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation was determined. At 24 h of reperfusion superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, vitamin C and E level decreased significantly in ischemic brain area ($p<0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.01$ respectively). After 72 h of reperfusion SOD and CAT activities surpassed the pre-ischemic level ($p<0.01$ and $p<0.05$ respectively). The level of vitamin C and E increased significantly at 72 hours after ischemia but, did not reach pre-ischemic levels ($p<0.01$ and $p<0.01$ respectively). Administration of vitamin C and E a week before cerebral ischemia prevented the decrease in SOD and CAT activities after 24 hours of reperfusion ($p<0.01$ and $p<0.01$ respectively). Furthermore, the increase in ischemia induced lipid peroxidation and cerebral edema were decreased significantly by administration of these vitamins ($p<0.01$ and $p<0.01$ respectively). In vitamins applied groups, increase in SOD and catalase activities at 72 hours after ischemia was similar to control. The results indicated that there is negative correlation between vitamin C or E level and lipid peroxidation or cerebral edema. Similar relationship was found between SOD or CAT activity and lipid peroxidation or cerebral edema.

Temporary cerebral ischemia changed the state of anti-oxidant defence system and these changes were significantly prevented by treatment with C and E vitamins before ischemia.

Key Words: Cerebral Ischemia, Antioxidant Defence System, Lipid Peroxidation.

GİRİŞ

İskemiye bağlı beyin harabiyetini minimal düzeye indirmek veya iyileştirmek için henüz geçerli spesifik tedavi yöntemleri bulunmamaktadır. İlerleyici ve geriye dönüşsüz serebral iskemik hasarın fizyopatolojik mekanizmaları karmaşıktır ve tüm ayrıntılarıyla bilinmemektedir. Bu mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşması, hücre harabiyetini durdurmaya yönelik yeni tedavi stratejilerinin

bulunmasını kolaylaştırabilir.

İskemi ve reperfüzyon sırasında enerji yetersizliği, iyon dengelerinin bozulması, hücre içi asidoz, fosfolipid metabolizmasında değişiklik, serbest yağ asitleri ve serbest oksijen radikallerinin (oksidiradikal) yapımında artış birçok biyokimyasal değişikliklerden bazılarıdır (1-4). Bu değişiklikler, başlangıç aşamalarında önlenemez veya düzeltilemezse hücreleri ölüme götürür. Reperfüzyondan sonra aerobik metabolizma sonucu bol



miktarda serbest oksijen radikalleri üretilir (5,6). Oksiradikaller; hücre membranındaki çeşitli enzimlerin inaktivasyonu, membran akışkanlığında azalma, iyonlara karşı membran geçirgenliğinde artma, membran lipitlerinin peroksidasyonu ve sonunda hücre ölümü ile sonuçlanan DNA zincirinde kırılmaya neden olur (7,8). Lipit peroksidasyonunun başlıca substratı doymamış yağ asitleridir ve doymamış yağ asitlerinden zengin olan beyin, serbest radikal hasarına karşı çok duyarlıdır (9,10).

Fizyolojik koşullarda canlı organizmalar serbest oksijen radikallerini metabolize eden antioksidan savunma sistemiyle korunurlar (11) Antioksidan savunma sistemini İskemik dokularda özellikle reperfüzyondan sonra medyana gelen oksiradikalleri tümüyle etkisizleştiremediği ve post-iskemik doku hasarında başlıca sorumlulardan birinin oksiradikal reaksiyonları olduğu kabul edilmektedir (11). Serbest radikal reaksiyonlarını azaltmanın, dokuları post-iskemik hasardan koruyabileceği düşünülmüş ve tedavi amacıyla çeşitli serbest radikal temizleyicileri ve serbest radikal oluşumunu önleyen ajanlar birçok organın post-iskemik hasarını azaltmada denenmiştir (12-16). Sıçanlarda yapılan araştırmalara göre antioksidan olarak bilinen Vitamin E nin diyetdeki miktarı ile post-iskemik serebral lipid peroksidasyonu ve beyin harabiyetinin boyutu arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (17-18)

Deneysel araştırmaların sonuçlarına göre; serebral iskemiyeye bağlı antioksidan savunma sisteminde bazı değişiklikler oluşmaktadır. Horakova ve arkadaşları geçici serebral iskeminin beyin korteksindeki antioksidan enzimlerden SOD aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı halde glutatyon peroksidaz aktivitesini azalttığını gözlemlemişlerdir (19). Polidori ve arkadaşlarına göre; kafa travması ve intrakraniyal kanamaların oluşturduğu beyin harabiyetinde oksidatif stres artmakta, antioksidanlardan askorbic asid ve alfa-tokoferolün plazma düzeyi azalmaktadır (17). Bununla birlikte; enzimatik ve nonenzimatik savunma sisteminde iskemik sonrası zamana bağlı değişiklikler, ayrıntılı olarak henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle bu

çalışmamızda geçici ön beyin iskemisi oluşturulan sıçanların antioksidan savunma sisteminde zamana bağlı olarak, iskemiden 24 ve 72 saat sonra gelişen değişiklikleri ve antioksidan ajanlardan C ve E vitaminlerinin bu değişikliklere etkisini incelemek istedik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada vücut ağırlıkları 300 - 400 g. arasında değişen 140 erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar sıcaklığı 20 ± 2 °C olan 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda normal laboratuvar yemi ile beslendiler. Her bir grupta 7 sıçan olacak şekilde hayvanlar 20 gruba (5 kontrol + 15 deney) ayrıldılar.

Deney gruplarına serebral iskemiden önce bir hafta süreyle farmakolojik dozda, 10 mg/kg/gün, E vitamini (α - tokoferol) ve 30 mg/kg/gün C vitamini intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol gruplarına aynı hacimde serum fizyolojik enjekte edildi (20)

Geçici ön beyin iskemisi oluşturmak için daha önce yapılmış araştırmalardaki model (21) kullanıldı. İntraperitoneal 100 mg/kg ketamin enjeksiyonu ile uyutulan sıçanların boyun bölgesinde yaklaşık 2 cm'lik orta hat inzisyonu ile bilateral arteria karotis kommünisler ve sol vena jugularis eksterna izole edildi. Arteriyel kan basıncını 50 mm Hg'ye düşürmek için vena jugularisten yaklaşık 3-4 ml kan alındı ve 5x1 mm atravmatik damar klempleri ile arteria karotis kommünisler kapatıldı. Otuz dakika sonra klempler çıkartıldı, alınan kan, hayvana geri verildi ve insizyon yeri 4x0 ipek iplikle dikildi. Serebral iskemisi sırasında vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçüldü ve ısıtıcı bir lamba ile 37 ± 1 °C de olması sağlandı. Serebral iskemiyeye maruz bırakılan sıçanlar reperfüzyondan 24 - 72 saat sonra ketamin anestezisi altında kardiyak ponksiyonla öldürüldüler. Soğuk serum fizyolojik perfüzyonu ile beyinler kandan arındırıldıktan sonra hızla çıkartıldı.

Beyin ödeminin belirlenmesi için deney sonrası öldürülen hayvanlardan hızla çıkartılan beyinler bekletilmeksizin yaş ağırlıkları belirlendikten sonra 60 °C de 48 saat kurutuldu ve kuru ağırlıkları ölçüldü (21). Kuru ağırlığın yaş ağırlığa yüzde oranı (P) formülde



belirtildiği şekilde hesaplandı. $P = \text{Kuru Ağırlık/Yaş Ağırlık} \times 100$. Elde edilen sonuç (P), beyin ödeminin hesaplanmasında kullanıldı:

$$\% \text{ Beyin Ödemi} = \frac{P(\text{kontrol}) - P(\text{deney})}{P(\text{deney})} \times 100$$

Beyin MDA düzeyinin belirlenmesi için optik kiazmanın önünden alınan beyin parçaları %1,15 KCL çözeltisiyle %10 luk homojenizat haline getirildi. Sonra Uchiyama ve Mihara'nın spektrofotometrik yöntemiyle belirlendi (22).

Süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin belirlenmesi için fosfat tamponuyla homojenize edilen iskemik ön beyin örnekleri etanol-kloroform karışımıyla ekstraksiyona maruz bırakıldıktan sonra diyalize bırakıldı. Total SOD aktivitesi Sugawara ve arkadaşlarının kullandığı yöntemiyle (23), katalaz aktivitesi ise Aebi yöntemiyle ölçüldü (24).

E ve C vitaminlerinin düzeyleri yüksek perfonmanlı likit kromatografisi ile ölçüldü.

İstatiksel Analiz: Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

İskemi sonrası, reperfüzyonun 24. saatinde SOD aktivitesi, kontrol değerine göre ortalama % 17,4, CAT aktivitesi %18,7 oranında azaldı (sırasıyla; $p < 0.05$ ve $p < 0.05$), Şekil: 1 ve 2). İskemi sonrası 24. saatte azalmış olan SOD ve CAT aktiviteleri, 72. saatte önemli ölçüde artarak iskemi öncesi değerleri aştı (sırasıyla; $p < 0.01$ ve $p < 0.05$).

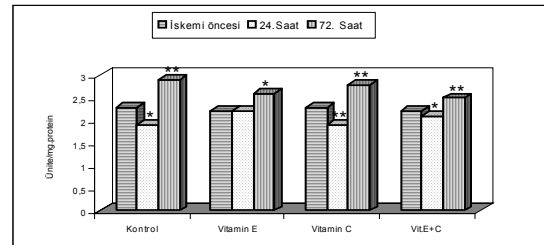
Serebral iskemi, sadece enzimatik antioksidanlardan SOD aktivitesinde değil nonenzimatik antioksidanlardan E ve C vitaminlerinin düzeylerinde de azalmalara neden oldu. İskemiye maruz kalan ön beyin bölgesinde reperfüzyonun 24. saatinde redükte vitamin E düzeyi ortalama %36,7 oranında azalırken redükte vitamin C düzeyi % 84,6 oranında azaldı (sırasıyla; $p < 0.01$ ve $p < 0.01$, Şekil; 3 ve 4). İskemi sonrası 24. saatte azalmış olan redükte vitamin E ve C düzeyleri, iskemiden 72 saat sonra yükselme gösterdiyse de iskemi öncesi değerlere ulaşamadı

(sırasıyla; $p < 0.01$ ve $p < 0.01$, Şekil; 3 ve 4).

Lipit peroksidasyon ürünü, MDA, iskemi sonrası 24. saatte önemli ölçüde arttı ve 72 saatte hafifce azalmasına rağmen normal düzeye dönmedi ($p < 0.01$, Şekil; 5).

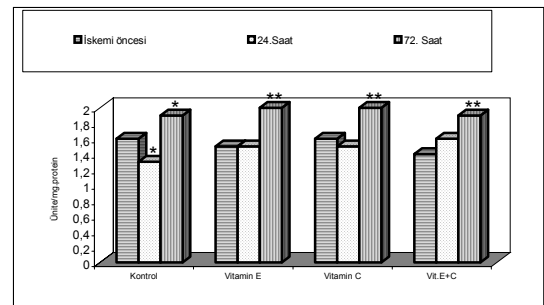
İskemiden bir hafta önce, vitamin E ve C'nin ayrı ayrı veya birlikte uygulandığı sıçanlarda lipit peoksidasyonu (MDA), önemli ölçüde azaldı (Şekil;5)

Beyin su içeriği, iskemiden 24 saat sonra % $28,5 \pm 4,1$ oranında arttı ($p < 0.001$) ve bu artış 72. saatte azalarak % $9,9 \pm 3,3$ düzeyine indi ($p < 0.01$). İskemi öncesi vitamin E ve C'nin ayrı ayrı veya birlikte uygulanması, iskemiye bağlı serebral ödem miktarını da önemli ölçüde azalttı (Şekil; 6)



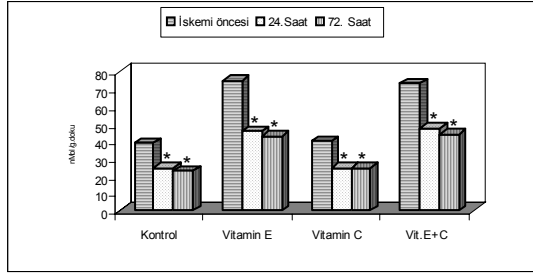
Şekil 1. Geçici serebral iskeminin SOD aktivitesinde oluşturduğu değişiklikler. Vitamin E ve C uygulamasının etkileri.

- İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi; (*); $p < 0.05$, (**); $p < 0.01$

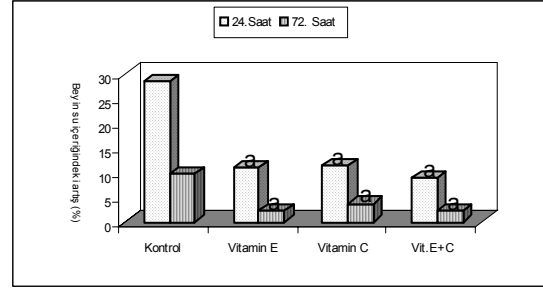


Şekil 2. Geçici serebral iskeminin CAT aktivitesinde oluşturduğu değişiklikler. Vitamin E ve C uygulamasının etkileri.

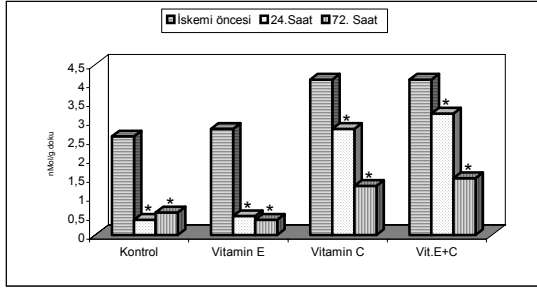
- İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi; (*); $p < 0.05$, (**); $p < 0.01$



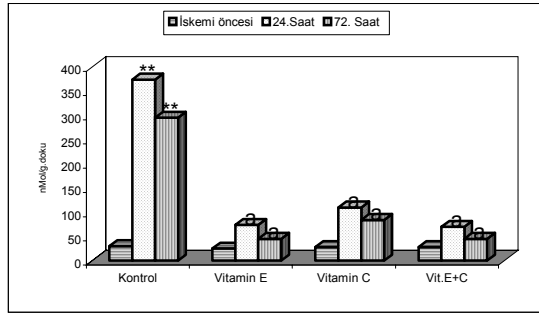
Şekil 3. Geçici serebral iskeminin Vitamin E düzeyinde oluşturduğu değişiklikler. Vitamin E ve C uygulamasının etkileri.
- İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi; (*) $p<0.01$



Şekil 6. Geçici iskeminin oluşturduğu beyin ödemi, vitamin E ve C uygulamasının etkileri.
- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi: (a); $p<0.01$



Şekil 4. Geçici serebral iskeminin Vitamin C düzeyinde oluşturduğu değişiklikler. Vitamin E ve C uygulamasının etkileri.
- İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi; (*) $p<0.01$



Şekil 5. Geçici serebral iskeminin oluşturduğu Lipit peroksidasyonu (MDA düzeyinde değişiklikler), Vitamin E ve C uygulamasının etkileri.
- İskemi öncesi ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi: (**); $p<0.01$
- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel önemi: (a); $p<0.01$

TARTIŞMA

Serbest radikalleri metabolize eden SOD ve Katalaz enzimlerinin iskemiden 3-24 saat sonra hafifce azaldığı ve 72 saat sonra arttığı gösterilmiştir (4). Bizim çalışmamızda da iskemiden 24 saat sonra bütün gruplarda serebral SOD aktivitesi yaklaşık %17 ve Katalaz aktivitesi %19 oranında azalırken iskemiden 72 saat sonra her iki enzim aktivitesi önemli ölçüde arttı. SOD ve Katalaz aktivitelerinin iskemiden sonra ilk 24 saatte azalması ve daha sonra 72 saatte artması serbest oksijen radikallerindeki artışa karşı beyin antioksidan savunma sisteminin tepkisi olarak değerlendirilebilir. Ancak, SOD ve Katalaz aktivitelerinin serebral iskemide değişmediğini belirten araştırmalar (25-26) bu konuda kesin bir açıklama yapmayı zorlaştırmaktadır.

İskemi sonrası nonenzimatik antioksidanlarda da değişiklikler olmaktadır. Kinuta ve ark . (27) göre iskemiden 24 saat sonra beyin redükte vitamin E düzeyi % 37 ve vitamin C düzeyi ise % 76 azalmaktadır. Bizim sonuçlarımız, bu değerlere oldukça yakındır. İskemiden 24 saat sonra antioksidanların hızlı bir şekilde azalması ve iskemiden 72 saat sonra hemen hemen durmuş olması serbest radikal reaksiyonlarının iskemiden 24 saat sonrası dönemde şiddetli olduğunu göstermektedir. Nitekim lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyi, iskemiden 24 saat sonra bütün gruplarda maksimum düzeye çıktı. C ve E vitaminlerinin uygulanması iskemiye bağlı SOD ve Katalaz aktivitelerindeki azalmayı (24. saatte) önlerken lipit peroksidasyonu ve



serebral ödemi de önemli ölçüde azalttı.

İskemi sonrası antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, beyin hasarının şiddetini belirlemede önemlidir. Nitekim SOD aktivitesinin inhibe edildiği durumlarda serbest radikal reaksiyonlarının artışına bağlı olarak doku harabiyetinin geliştiği ve ekzojen SOD uygulamasının travma sonrası beyin ödemi azalttığı gösterilmiştir (4,28).

Serbest radikal reaksiyonlarının zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemi, iskemi ve reperfüzyon sırasında değişikliğe uğrar mı? Post-iskemik ödem ve doku hasarı sadece serbest radikallerin oluşumundaki artıştan mı kaynaklanıyor? Yoksa antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması da söz konusu olabilir mi? İlk sorunun yanıtıyla ilgili olarak, çok sayıda deneysel çalışma, serebral iskemi ve reperfüzyon sırasında serbest radikal yapımının arttığını ve beyin hasarında artmış bulunan bu serbest oksijen radikallerinin önemli rol oynadığını göstermektedir (12-19, 26). Bununla birlikte, post-iskemik doku hasarında serbest radikal reaksiyonlarındaki artışla birlikte antioksidan savunma sisteminin yetersizliğinin de söz konusu olup olmadığı tartışılmaktadır (4,15) Ancak, bu konuyla ilgili yapılmış olan araştırmaların sonuçları arasında çelişkiler bulunmaktadır. Glikol ile birleştirilmiş süperoksit dismutaz ve katalaz'ın ekzojen olarak uygulanması iskemik beyin hasarını önemli ölçüde azaltmaktadır (8). Engerson ve ark. ile Werns ve arkadaşlarına göre serebral iskemi süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini değiştirmemektedir (25, 26). Bizim bu çalışmamızda iskemi sonrası her iki enzim aktivitesi önemli ölçüde arttı. Bulgularımız, Aebi ve arkadaşlarıyla Sutherland ve arkadaşlarının çalışmalarını (4, 29) desteklemektedir. Konuyla ilgili yapılmış olan çalışmaların sonuçları arasında benzerlik olmaması; muhtemelen metod, tür ve iskemi modellerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Bu çalışma; geçici serebral iskemide antioksidan savunma sistemindeki etkinliğin ilk 24 saatte azaldığını ve bu azalmanın pre-iskemik dönemde C ve E vitamini uygulanmasıyla önlenemediğini göstermektedir. Ayrıca,

iskemiye bağlı lipit peroksidasyon artışı ve serebral ödemin büyük bir olasılıkla antioksidan savunma sistemindeki zayıflamaya bağlı olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bulgularımız, geçici serebral iskeminin antioksidan savunma sisteminde zamana bağlı değişikliklere neden olduğunu, iskemi öncesi E ve C vitaminleri uygulamasının iskemi sonrası 24. saatte ortaya çıkan değişiklikleri önlediğini, iskemiye bağlı gelişen lipit peroksidasyonu ve ödemin antioksidan savunma sisteminin durumuyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. 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 α -tocopherol administration. *Stroke*, 1983; 14:977-82.
2. Asano T, Johshita H, Koide T, Takakura K. Amelioration of ischemic cerebral oedema by a free radical scavenger, AVS; 1,2 bis(nicotinamido)- propane. An experimental study using a regional ischaemia model in cats. *Neurol Res*, 1984; 6:163-8.
3. Watson BD, Busto R, Goldber WJ, Santiso M, Yoshida S, Ginsberg MD. Lipidperoxidation in vivo induced by reversible global ischemia in rat brain. *J Neurochem*, 1984; 42:268-74.
4. Aebi K, Satoshi Y, Kogure K. Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke*, 1988; 19: 480-5.
5. Hall ED, Pazara KE, Braughler JM. 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*, 1988; 19:997-1002.
6. Patt A, Harken AH, Burton LK, Rodell TC, Piermattei WJ. Xanthine oxidase derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion induced edema in gerbil brain. *J Clin Invest*, 1988; 81:1556-62.
7. Young W, Wojak JC, DeCrescito V. 21-Aminosteroid reduces ion shifts and edema in the rat middle cerebral artery occlusion model of regional ischemia. *Stroke*, 1988; 19: 1013-9.



8. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 1989; 256:589-93.
9. Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz AL. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1989; 20: 488-94.
10. Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman M. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand*,(suppl) 1980; 492:91-119.
11. Leibovitz BE, Siegel BV. Aspects of free radical reactions in biological systems. *Aging J Gerontol*, 1980; 35:45-56.
12. Braughler JM, Hall DE. Central nervous system trauma and stroke. Biochemical consideration for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radical Biol Med*, 1989; 16:289-301.
13. Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*, 1984; 34:315-20.
14. Olesen SP. Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta Physiol Scand*, 1987; 129:181-7.
15. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 1985; 312:159-163.
16. Mochowiz SH, Melamed E, Pikarsky E, Rappaport H. Effect of ischemia induced by middle cerebral artery occlusion on superoxide dismutase activity in rat brain. *Stroke*, 1990; 21:1613-7.
17. Kontos HA, Polivshok JT. Oxygen radicals in brain injury. *CNS Trauma*, 1986; 3:257-1263.
18. Horakova L, Uraz V, Ondrejickova L, Juranek I. Effect of stobadine on brain lipid peroxidation induced by incomplete ischemia and subsequent reperfusion. *Biomed Biochem Acta*, 1991; 50:1019.
19. Mishima K, Tanaka T, Pu F, et al. Vitamin E isoforms α -tocopherol and γ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neuroscience Letters*, 2003; 337:56-60.
20. Anitta Patti Alden H, Lis K, et al. Xanthine Oxidase-derived Hydrogen Peroxide Contributes to Ischemia Reperfusion induced Edema in Gerbil Brains. *J Clin Invest*, 1988; 1556-62.
21. Uchiyama M, Mihara M. Determination malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Analyt Biochem*, 1978;86:271-278.
22. Suqawara M, et al. Deficiency of superoxide Dismutase in Epidemic Tissue. *J Clin Endocrin Metabol*, 1988;67:115-61.
23. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzimology*. 1984; 86:271-278.
24. Engerson TD, Mc Kelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Synder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987; 79:1564-70.
25. Werns SW, Shea MJ, Mitsos SE, et al. Reduction of the size of infarction by allopurinol in ischemic reperfused canine heart. *Circulation*, 1986; 73:518-24.
26. Smith JK, Carden DL, Korthuis RJ. Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1989; 257:1782-9.
27. Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1987; 19:1053-60.
28. Polidori MC, et al. Plasma Vitamin C Levels are Decreased and Correlated With Brain Damage in Patients with Intracranial Hemorrhage or Head Trauma. *Stroke*, 2001;32: 898-902.



29. Sutherland G, Bose R, Louw D, Pinsky C. Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in rat. *Neurosci Lett* 1991; 128:169-72.

