

UZUN SÜRELİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ ÜZERİNE NSAİ ve SAİ ETKİSİ

EFFECT of SAD and NSAD on LONG TERM CEREBRAL ISCHEMIA
in RABBIT

Hakan Hadi KADIOĞLU, Cemal GÜNDOĞDU, Erhan TAKÇI,
Çetin R. KAYAOĞLU, Yusuf TÜZÜN, Mehmet D. AYDIN, İsmail Hakkı AYDIN

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji (HHK, ET, ÇRK, YT, MDA, İHA)
ve Patoloji (CG) Anabilim Dalı

Özet;

Anoksi, kardiyak arrest, strok, asfiksi, kranioserebral travma, neoplazmlar, enfeksiyon gibi birbirinden farklı olaylar sonucunda meydana gelebilen serebral iskemi mortalite ve morbiditeyi belirleyici niteliktedir. İskemik nöronal yaralanmayı azaltmak, iskeminin başlangıcıyla devreye giren ve nöronal ölümle sonlanan reaksiyonlar zincirinin bir yerinde durdurulması ile mümkün olabilir. Bu düşünceyle, üç aşamalı bir çalışmanın ilk kısmı olarak serebral iskemide steroidal (SAİ) ve nonsteroidal ilaçların (NSAİ) serebral protektif etkisini araştırdık. Bu amaçla, karotis oklüzyonu ile oluşturduğumuz serebral iskemi modellenmiş deneysel çalışmamız sonucunda, SAİ ve NSAİ uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre tahribat görmemiş nöron sayısında bariz bir fazlalığın olduğu; SAİ ve NSAİ uygulanan gruplar arasında birbirlerine belirgin bir üstünlüğün olmadığını belirledik. İskemi oluşumundan çok kısa bir süre önce düşük dozda SAİ (dexamethasone) veya NSAİ'lerin (tenoksikam) verilmesi serebral koruyucu etki sağlayabilir. Pratik uygulama için ise, iskemi sonrası da bu etkinliğin olup olmadığını gösteren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler; *Serebral iskemi, Dexamethasone, Tenoksikam*

AUTD 1995, 27: 20-24

Summary;

Cerebral ischemia occurring as a result of various pathological process as anoxia, cardiac arrest, stroke, asphyxia, cranio-cerebral traumas, neoplasms, infections has determine the mortality and morbidity. For the chain of reactions activating on occurring of ischemia and resulting in neuronal death to be interrupted in any stage may decrease ischemic neuronal damage. With this consideration, we investigated the cerebral protective effect of steroidal (SAD) and non-steroidal drugs (NSAD) in cerebral ischemia. In the result of this research, we determined that the number of undamaged neurons in the groups administered SAD and NSAD was prominently more than that of the control group, and no superiority between SAD and NSAD groups. We concluded that, the administration of low dose SAD (dexamethasone) and NSAD (tenoksikam) just before cerebral ischemia occurred may prove a cerebral protective effect. But, it is required studies proving whether the drugs have any protective effect after occurring ischemia for application in practice.

Keywords; *Cerebral ischemia, Dexamethasone, Tenoksikam*

MJAU 1995, 27:20-24

Giriş;

Normalde beyinde az miktarlarda bulunan serbest yağ asitleri (SYA) iskemi gibi durumlarda birikim göstermektedir (1). SYA'nın esas olarak hücre membranını bozabilme yeteneklerinden dolayı, beyin yapısı ve fonksiyonları üzerine zararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (2). SYA'nın salınması fosfolipazı aktive etmekte ve membran fosfolipidlerinin yıkımına neden olmaktadır (3). Hücre membranındaki fosfolipidler ile proteinler

arasındaki dengenin bozulması membranın kalsiyum geçirgenliğini artırmakta ve bunun sonucunda iskemik hücrede oluşan, hücre içi kalsiyum miktarındaki artışa bağlı olarak mitokondriyal fonksiyonlarda anormallikler meydana gelmektedir. Bu yolla olan membran fosfolipidlerinin tüketimi ve SYA'nın metabolizması irreverzibl hücre yaralanmasına yol açan olaylar zincirini başlatmaktadır (4).

Tablo1: Deney Öncesi ve Sırasında Saptanan Kan Basıncı ve Kan Gazı Değerleri

Değişken	Kontrol Grubu	NSAİ Grubu	SAİ Grubu
Ortalama Kan Basıncı			
oklüzyon öncesi	115 ± 5	113 ± 3	119 ± 9
oklüzyon sırasında	110 ± 5	109 ± 5	118 ± 7
pH			
oklüzyon öncesi	7.40 ± 0.02	7.41 ± 0.01	7.41 ± 0.01
oklüzyon sırasında	7.38 ± 0.01	7.41 ± 0.02	7.39 ± 0.01
PO ₂			
oklüzyon öncesi	122.3 ± 2.5	119.3 ± 2.5	119.0 ± 3
oklüzyon sırasında	123.0 ± 3.5	118.2 ± 3.2	118.8 ± 3.3
PCO ₂			
oklüzyon öncesi	38.7 ± 0.8	38.8 ± 0.2	39.1 ± 0.7
oklüzyon sırasında	38.9 ± 0.8	39.4 ± 0.6	39.1 ± 0.5

Beyin dokusundaki membran fosfolipidlerini oluşturan asıl komponentlerden birisi olan ve diğer SYA gibi iskemi, yaralanma ve nöbetler sırasında birikim gösteren serbest araşidonic asit (AA) patolojik süreçlere kısmen aracılık eder (1,3,5,6).

Gereç ve Yöntem;

Çalışma, 28 ergin melez erkek tavşan üzerinde yapıldı (ortalama ağırlıkları 2.5 ± 0.4 kg.). Deneklerin 6'sı iskemi oluşturulmayan kontrol grubu, 6'sı iskemi oluşturulan kontrol grubu, 8'i NSAİ ve diğer 8'i SAİ verilen grup olarak ayrıldılar. Hayvanlar nörolept anestezi ile (fentanyl 0.4 mg + droperidol 20 mg. dan oluşan bir karışım hazırlanarak 0.002 ml/gr i.m.; atropine sulphate 0.00001 mg/gr s.c. verilerek) uyuutulduktan sonra operasyon masasına alınıp supine pozisyon verildi. Omuzdan omuza yapılan servikal insizyon ve bunu izleyen diseksiyonla ortak karotis arter (CCA), internal ve eksternal karotis arterleri (ICA, ECA) her iki tarafta ortaya çıkarılıp serbestleştirildi.

Sistemik arteriyel kan basıncını, pH, PO₂ ve PCO₂' sini izlemek için sol femoral arter açığa çıkarılıp kateterize edildi. ICA'lerde oklüzyon oluşturmadan önce kan basıncı ölçüldü ve kan örneği alındı.

Daha sonra bilateral ICA, vasküler deney klipi kullanılarak 40' süre ile oklüde edildi. Oklüzyon ortadan kaldırıldıktan sonra 2 saat izlenen deneklerde anestezi 20' da bir karışımın 0.0002 ml/gr dozda verilmesi ile devam ettirildi. 1/2 saatlik aralar ile kan basıncı ölçüldü. Sakrifiye

edilmeden hemen önce kan gazlarına tekrar bakıldı.

NSAİ grubundaki deneklere oklüzyondan 1/2 saat önce 0.004 mg/gr dozda tenoksikam, SAİ grubundakilere ise 6 saat önce dexamethasone sodium phosphate intraperitoneal olarak bir defada verildi.

Sakrifikasyon, anestezi için kullanılan karışımın yüksek dozda (0.01 ml/gr) i.m. verilmesi ile gerçekleştirildi. Kardiyak arrest olmadan intrakardiyak formalin enjeksiyonu yapıldı. Sakrifikasyonun ardından denekler süratle dekapitize edilerek serebrumları çıkarıldı ve % 10'luk fosfatla tamponlanmış formaldehid solusyonunda 3 gün süre ile fikzasyona alındılar. Hipokampusları açığa çıkaracak biçimde ve papilla mammarialar düzeyinden geçen 5 mm kalınlığında koronal kesitler alındı. Doku örnekleri farklı dilüsyonlarda alkolden geçirilip dehidrate edildikten sonra parafin ile bloklandı. Bu bloklardan 5 µm kalınlığında yapılan kesitler H&E ile boyanarak ışık mikroskopu ile incelendiler.

Mikroskopik değerlendirme neokortekste (NC) aynı kesitlerde sagittal fissuradan eşit uzaklıkta olarak NC'nin 3. ve 5. tabakalarında, hipokampusun cornu amnois (CA) 1,3 ve 4. bölgelerinde, gyrus dentatus (DG) ve talamusta farklı üç büyük büyütme alanındaki nöronların iskemik ve noniskemik olarak ayrılıp sayısal verilerin elde edilmesiyle yapıldı. Piknotik veya büyük hiperkromatik nükleus, belirgin asidofilik sitoplazma veya belirgin sitoplazmik daralmalar içeren hücreler iskemik nöron olarak kabul edildi. Elde edilen verilerin ortalamaları alındı; standart sapmaları belirlendi.

Tablo2:Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

	A		B		C		D	
	nishs	ishs	nishs	ishs	nishs	shs	nishs	ishs
NC	42±3	4±2	0	41±5	25 ±15	21±15	25±12	29±17
DG	120±5	0	25±15	102±31	81±44	45±37	62±45	64±51
Th	46±5	2±1	64±0	25±5	30±13	5±3	24±13	9±8
Hipokampus								
CA1	58±3	1±0	16±6	46±9	60±4	4±3	55±8	2±1
CA3	38±4	2±1	3±1	45±6	35±10	11±9	25±15	19±17
CA4	41±3	1±0	9±4	26±3	31±11	11±3	20±15	14±13

A: İskemi oluşturulmayan kontrol grubu, B: İskemi oluşturulan kontrol grubu, C: Dexamethasone verilen grup, D: Tenoksikam verilen grup; ishs: İskemik hücre sayısı, nishs: Non-iskemik hücre sayısı; NC: Neokorteks, DG: Dentat gyrus, Th: Talamus, CA: Corno Amnois

Bulgular;

Deneklerin deney öncesi ve sırasında yapılan kan basıncı, pH, PO₂ ve PCO₂ izlemelerinde kıymetli değişiklikler olmadığı gözlemlendi. Bunlara ilişkin veriler Tablo 1' de özetlendi.

Mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen veriler Tablo 2'de gösterildi. Oklüzyon yapmadığımız gruptaki değerler ile oklüzyon yaptığımız gruptaki asidofilik dejenerasyon gösteren hücre sayıları arasında önemli fark olduğu görüldü.

İskemi oluşturulan grupta DG'ta belirlenen normal nöron sayısı ortalama 24±15, CA1'de 16±6, CA4'de 9±4 olarak bulundu. SAİ ve NSAİ verilen deneklerde NC, CA1 ve CA3'deki sayısal değerler birbirine yakındı (25±15, 25±12; 60±4, 55±8; 35±10, 25±15). SAİ verilen grupta belirlenen normal nöron değerleri, DG'ta 81±44, talamusta 30±13, CA4'de 31±11 idi. NSAİ uygulanan grupta ise bu değerler sırasıyla 62±45, 24±13, 20±15 idi.

Tartışma;

Akut serebral iskemide ortaya çıkan ve tedrici artış gösteren AA ve diğer SYA'lar, hücre membranını bozarak serebral yapı ve fonksiyonları olumsuz olarak etkiler (7-10).

Patofizyolojik durumlarda, yalnız AA'nın değer aynı zamanda prostaglandinler ya da lökotrienler gibi AA metabolitlerinin de aracı bir fonksiyona sahip oldukları düşünölmektedir (11). Bu süreç içinde PGG₂'nin PGH₂ ye çevrimi sırasında oksijen radikalleri üretilir. Bunlar hücre membran permeabilitesini bozdukları gibi, serebral koruyucu özelliği de olan PGI₂'nin

sentzini de inhibe edebilmektedir (12). Lökotrienler ise, düz kaslar üzerinde güçlü kontraksiyon yaptırabilme ve hücre membran permeabilitesini değiştirme özelliğine sahiptir (13). İskemi esnasında lökotrien ve prostaglandinlerin konsantrasyonları önemli ölçüde artar. Lökotrienler kan damarlarından protein ekstrasvasyonu ve polimorf nüveli lökosit (PMNL) 'lerin aktivasyonuna neden olur (14). Hallenbeck ve ark. (15), erken postiskemik periyotta düşük kan akımı olan bölgelerde önemli miktarda PMNL birikimi olduğunu göstermişlerdir. Reperfüzyon döneminde lökositlerin toplanması lökosit türevli süperoksit oluşumunu ortaya çıkarmaktadır (11).

Deneyssel araştırmalar, serebral iskeminin başlangıçta sitotoksik bir ödeme neden olduğunu göstermektedir (16-18). Chan ve Fishman (19) ile Unterberg ve ark. (20) tarafından yapılan çalışmalarda, AA'nın beyin ödeminde önemli role sahip olduğu, yağ asitinin kan beyin bariyerinin permeabilitesini artırdığı ve serebral şişmeyi indüklediği bulunmuştur. İskemi veya fokal injuri gibi patofizyolojik durumlarda yağ asitlerinin konsantrasyonlarındaki artış doza bağlı olarak hücre hacmini artırmaktadır (1,5). Aynı doğrultuda olarak Staub ve ark. (3), AA'nın glial hücre şişmesini önemli ölçüde indüklediğini göstermişlerdir.

İskemik beyinde vazoaktif maddelerin varlığı zararlı sonuçlara neden olur. AA'nın zararlı özellikleri birçok araştırmada gözlenmiştir. Mesela, lipid peroksidasyonu ya da mitokondrilerdeki solunum zinciri bozukluğu yağ asiti tarafından indüklenmektedir (21,22). Bunun gibi, lökotrienlerin neden olduğu hücre

zarı permeabilitesindeki değişiklik hücre içine kalsiyum akışını artırmaktadır (13). Deneysel modeller, lipid peroksidasyonunun yaralanmış veya iskemik dokuların birçoğundan köken alan serbest oksijen radikalleri tarafından başlatıldığını göstermektedir. Gerek iskemiye bağlı olarak doğrudan, gerek PGG₂'nin PGH₂'ye çevrimi sırasında ortaya çıkan oksijen radikalleri ve gerekse de lökosit türevli süperoksitler hücre membranında bulunan yağ asitleri ile domino benzeri bir progresyonla membrandaki diğer yağ asitlerinden yeni serbest radikalleri ortaya çıkarabilen bir karşılıklı etkileşime girerler. Bu oksidatif yıkım cereyanının primer membran disfonksiyonuyla, hatta yeterince şiddetli ise hücre ölümü ile sonuçlandığına inanılmaktadır (2,4,6,12,13,17, 23). İskemik dokuda biriken SYA ve metabolitlerinin potansiyel tahripkar etkilerinin bloklanması hücre ölümüne neden olan kalsiyumun hücre içine akışını azaltabilir.

Çalışmamızda iskemi oluşturduğumuz kontrol grubundaki deneklerde DG ve NC' deki normal nöron sayısında diğer kısımlara göre fazlalık olsa da bu oransal olarak fazla değerli görülmemektedir. Ancak, gerek SAI ve gerekse NSAI verilen gruplarda, özellikle DG, talamus ve CA4'deki normal nöronlarda hem sayısal hem de oransal olarak fazlalık dikkat çekicidir.

Sunduğumuz sonuçlarda, fosfolipazı inhibe eden dexamethasone'un, siklooksijenazı inhibe eden tenoksikam'dan bariz olmamakla beraber biraz daha fazla preventif etki sağladığı görülmektedir. NSAİ'ler siklo ve lipoksijenaz enzimlerini bloklayarak AA'dan hidro ve endoperoksitlerin ortaya çıkışını irreverzibl olarak engeller. Bu yolla PGG₂'nin PGH₂'ye çevrimi sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikali oluşumu da engellenmektedir. Lökotrien üretiminin bloklanması ile de lökosit türevli süperoksit oluşumuna engel olunmaktadır. Gözlediğimiz preventif etki buna bağlı olabilir.

Kortikosteroidlerin iskemi koşullu ödeme etkisini araştıran hayvan deneyleri çelişkili sonuçlar vermektedir (24,25). Chumas ve ark. (26), iskeminin oluşumundan 6 saat önce düşük dozda verilen dexamethasone'un serebral protektif etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bunun aksine, kortikoidlerle iskemik hasarın kötüleştiğine ilişkin yayınlar da bulunmaktadır (27,28). Yüksek doz uygulanan kontrollü klinik araştırmalarda alınan oldukça ümit kırıcı sonuçlardan dolayı (29), bugün genel olarak apoplektik olgularda kortikoid uygulamasının reddedilmesi gerekiyor. Ama burada da, çok

erken uygulamaların olumlu bir etkisinin olup olmayacağı sorusu cevapsız kalmaktadır.

Membran fosfolipidlerinden AA oluşumunun ve AA'nın endo ve hidroperoksitler üzerinden katabolize edilmesinin durdurulması, serebral nöronal ve vasküler yapı üzerindeki AA ve türevlerinin zararlı etkilerini azaltarak, iskemiye bağlı hasarı göreceli olarak hafifletebilir. Bu düşünceyle iskemi oluşumundan çok kısa bir süre önce düşük dozda SAI (dexamethasone) veya NSAI'ların (tenoksikam) verilmesi serebral koruyucu etki sağlayabilir. Pratik uygulama için ise, iskemi sonrası da bu etkinliğin olup olmadığını gösteren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar;

1. Kinouchi H, Imaizumi S, Yoshimoto T, Motomiya M: Phenytoin affects metabolism of free fatty acids and nucleotides in rat cerebral ischemia. *Stroke* 1990; 21: 1326-1332
2. Raichle ME: The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol* 1983; 13: 2-10
3. Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Baethmann A: Glial swelling and damage by arachidonic acid. In Hartmann A, Yatsu F, Kuschinsky W (eds): *Cerebral Ischemia and Basic Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, 1994: 230-234
4. Farber JL, Chien KR, Mittnech S Jr: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 1981; 102: 271-281
5. Baethmann A, Maier-Hauff K, Schürer L, Lange M, Guggenbichler C, Vogt W, Jacob K, Kempfski O: Release of glutamate and free acids in vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 1989; 70: 578-591
6. Siesjö BK, Ingvar M, Westerberg E: The influence of bicucilline-induced seizures on free fatty acid concentration in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Neurochem* 1982; 39: 796-802
7. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Aldes I, Ginsberg MD: Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989; 20: 904-910
8. Schuier FJ, Hossmann K-A: Experimental brain infarctin cats. II. Ischemic brain edema. *Stroke* 1980; 11: 593-601
9. Schwartz JH, Kandel ER: Elementary interactions between neurons. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds): *Principles of Neural Science*, II.ed, Elsevier, New York, 1991: 172-193

10. Tyson GW, Teasdale GM, Graham DI, McCulloch: Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann Neurol* 1984; 15: 559-567
11. Schmid-Schönbein GW, Del Zoppo GJ: Mechanisms of leucocyte-mediated no-reflow and tissue injury in the microcirculation. In Hartmann A, Yatsu F, Kuschinsky W (eds): *Cerebral Ischemia and Basic Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, 1994: 331-351
12. Moncada S, Vane JR: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessels walls. *N Eng J Med* 1979; 300: 1142-1147
13. Wolfe LS: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J Neurochem* 1982; 38: 1-14
14. Saito K, Levine L, Moskowitz MA: Blood components contribute to rise in gerbil brain levels of leukotriene-like immunoreactivity after ischemia and reperfusion. *Stroke* 1988; 19: 1395-1398
15. Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreas TJ: Polymorphonuclear leucocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 1986; 17: 246-253
16. Hatashita S, Hoff JT: Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1990; 21: 582-588
17. Hossmann K-A, Scheier ZJ: Experimental brain infarcts in cats. 1. pathological observations. *Stroke* 1980; 11: 583-592
18. Petito CK: Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *Neuropathol Exp Neurol* 1979; 38: 222-234
19. Chan PH, Fishman RA: Brain edema: induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science* 1978; 201: 358-360
20. Unterberg A, Wahl M, Hammersen F, Baethmann A: Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; 73: 209-219
21. Braughler JM, Hall ED: Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 289-301
22. Hillered L, Chan PH: Role of arachidonic acid and other free fatty acids in mitochondrial dysfunction in brain ischemia. *J Neurosci Res* 1984; 9: 1689-1698
23. Camarata PJ, Heros RC, Latchow RE: Brain attack: the rationale for treating stroke as a medical emergency. *Neurosurgery* 1994; 34: 144-158
24. Barbosa- Cautinho LM, Hartmann A, Hossmann K-A, Rommel T: Effect of dexamethasone on serum extravasation in experimental brain infarcts of monkey: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1985; 65: 255-260
25. Okamatsu S, Peck RC, Lefer AM: Protective actions of dexamethasone in acute cerebral ischemia. *Circ Shock* 1982; 9: 445-456
26. Chumas PD, Del Bigio MR, Drake JM, Tuor UI: A comparison of the protective effect of dexamethasone to other potential agents in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurosurg* 1993; 79: 414-420
27. Sapolsky RM: Glucocorticoids and hippocampal damage. *TINS* 1987; 10: 346-349
28. Sapolsky RM, Pulsinelli W: Glucocorticoid potentiate ischemic injury in neurons: therapeutic implications. *Science* 1985; 229: 1397-1400
29. Norris JW, Hachinski VC: High dose steroid treatment in cerebral infarction. *Brit Med J* 1986; 292: 21-23

Yazışma Adresi:

Dr. Hakan Hadi KADIOĞLU
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroşirurji A.B.D. 25240- Erzurum