

AKUT İSKEMİK STROKTA PLAZMA ENDOTELİN-1 DÜZEYLERİ

PLASMA ENDOTHELIN-1 LEVELS IN ACUTE ISCHEMIC STROKE

Orhan DENİZ, Fatih AKÇAY, Mustafa YILMAZ

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji (OD, MY), Biyokimya (FA) Anabilim Dalı, Erzurum,

XIII. Ulusal Biyokimya Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

Özet

Klinik ve tomografik olarak non-hemorajik serebral infarkt tanısı konularak yatırılan 25 hastada, strok gelişiminden sonraki ilk 72 saat içinde plazma endotelin-1 (ET-1) düzeyleri radioimmunoassay (Amersham,UK) metoduyla ölçüldü. Hasta grubunun plazma endotelin-1 düzeyleri (5.04 ± 1.92 pg/mL), benzer yaş dağılımına sahip 20 kişilik kontrol grubunun düzeylerinden (2.60 ± 0.44 pg/mL) belirgin olarak yüksekti ($p < 0.001$). Strokun ilk 24 saati içinde ölçülen plazma ET-1 düzeyleri (6.22 ± 1.63 pg/mL), 24-72 saat içinde ölçülen ET-1 düzeylerinden (4.25 ± 1.70 pg/mL) anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$). Ağır nörolojik defisitli hastaların plazma ET-1 düzeyleri (5.27 ± 1.90 pg/mL), ılımlı nörolojik defisitli hastaların ET-1 düzeylerinden (4.61 ± 2.03 pg/mL) daha yüksekti; ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Sonuç olarak; iskemik strokun, plazma ET-1 düzeylerinde akut ve belirgin yükselmeye birlikte olduğunu bulduk. Bu durum, infarkt dokusunda hasara uğramış endotel hücreleri tarafından artırılmış üretimi yansıtabilir. ET-1'in lokal salınımı kollateral damarların ağır ve uzamış konstriksiyonuna neden olabilir ve bu yüzden serebral infarktın patogenezi ve sonuçlarında olumsuz bir role sahip olabilir.

Anahtar kelimeler: *Serebral iskemi, Endotelin-1*

Summary

Plasma endothelin-1 (ET-1) levels were measured by a radioimmunoassay method (Amersham, UK) in 25 patients within the first 72 hours after the onset of nonhemorrhagic cerebral infarct, as diagnosed clinically and by computed tomography. There was a marked elevation in plasma ET-1 levels in the patients (5.04 ± 1.92 pg/mL) compared with those in the control group of 20 age-matched subjects (2.60 ± 0.44 pg/mL; $p < 0.001$). Plasma ET-1 levels measured during the first 24 hours (6.22 ± 1.63 pg/mL) were found to be higher than those measured between 24-72 hours after the stroke (4.25 ± 1.70 pg/mL; $p < 0.05$). Plasma ET-1 levels in patients with more severe neurological impairment (5.27 ± 1.90 pg/mL) tended to be higher than those in the patients with milder impairment (4.61 ± 2.03 pg/mL); this trend, however, did not reach statistical significance ($p > 0.05$). As a result, we found that ischemic stroke is associated with acute and marked increases in plasma ET-1 levels. This may reflect enhanced production by damaged endothelial cells within the infarcted tissue. Local leakage of ET-1 may induce severe and prolonged constriction of collateral vessels and may therefore have a deleterious role in the pathogenesis and final outcome of cerebral infarction.

Key words: *Cerebral ischemia, Endothelin-1*

AÜTD 1996, 28:205-208

MJAU 1996, 28:205-208

Endotelinler son yıllarda bulunan en güçlü vazokonstriktör peptid gruplarıdır (1,2). İlk olarak Yanagisawa ve ark. (3) tarafından domuz aorta endotelial hücre kültürlerinden izole edilmiş olup, endotelin-1 (ET-1), endotelin-2 (ET-2), endotelin-3 (ET-3) olarak isimlendirilen farklı üç tipi bulunmaktadır (4,5). ET-1 endotelial hücreler tarafından üretilir (6) ve serebral mikrodamarlar ET-1'e belirgin duyarlılık gösterirler (7). Subaraknoid hemorajili hastaların serebrospinal sıvılarında ET-1 konsantrasyon yüksekliği serebral vazospazmın oluşumunda bu peptidin rolü olduğunu düşündürmektedir (8). Teorik olarak akut serebral iskemide zarar görmüş endotelial hücreler, artmış ET-1 sekresyonunun kaynağı olabilir. Böylece gelişebilecek ağır ve uzun süreli vazokonstriksiyon,

serebral hasarın patogenezi ve sonuçlarında rol oynayabilir. Bundan dolayı, biz bu çalışmada, iskemik strokun akut fazında ET-1'in plazma konsantrasyonunu ölçmeyi ve ET-1 düzeyleriyle klinik tablo arasında bir ilginin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık.

Materyal ve Metod

Haziran-Aralık 1995 dönemi içinde servisimizde yatarak tedavi gören 25 akut stroklu hasta bu çalışmaya alındı. Hastaların 10'u kadın, 15'i erkek, yaş ortalaması 64.5, yaş alt-üst değerleri 45-83 yıl idi. Bütün hastalar akut iskemik stroka bağlı ani fokal nörolojik defisitleri nedeniyle hospitalize

Tablo 1. Kontrol ve Strok

gruplarının endotelin-1		(ET-1) düzeyleri (pg/mL;ortalama±SD)
		< 24 st (n:10) 6.22±1.63**
		> 24 st (n:15) 4.25±1.70
Kontrol (n:20) 2.60±1.63	SIH (n:25) 5.04±1.9 2*	IND (n:9) 4.61±2.03♦
		AND (n:16) 5.27±1.90
		KİH (n:15) 4.99±2.34•
		SKİH (n:10) 4.70± 1.53

SIH: Serebral infarktlı hastalar, < 24 h: ET-1 düzeyleri ilk 24 saat içinde ölçülen hastalar, < 24 h: ET-1 düzeyleri 24-72 saat içinde ölçülen hastalar, IND(CNS:6.5-8): ılımlı nörolojik defisiti olan hastalar, AND (CNS:2.5-5): Ağır nörolojik defisiti olan hastalar, KİH: Kortikal infarktlı hastalar, SKİH: Subkortikal infarktlı hastalar

*: $p < 0.001$ Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, **: $p < 0.05$ > 24 h grubuyla karşılaştırıldığında

♦: $p > 0.05$ AND grubuyla karşılaştırıldığında, •: $p > 0.05$ SKİH grubuyla karşılaştırıldığında

edilmişlerdi. Akut iskemik strok tanısı komputerize beyin tomografisi (BT) ile doğrulandı. Yirmibir hastada hemiparezi veya hemipleji belirlendi. Oniki hastada sağ hemiparezi/hemipleji ile birlikte afazi de vardı. Dokuz hastada nörolojik defisitler ılımlı olarak değerlendirildi. Bu hastaların kabulde Canadian Nörolojik Skala (9) skorları (CNS:6,5-8 arasında değişiyordu. Bunlar 72 saat sonra nörolojik defisitlerinde belirgin iyileşme gösterdiler. Diğer 16 hastanın kabulde CNS'ları 2,5-5.0 arasında değişiyordu ve kısa sürede iyileşebileceklerine işaret eden delillere sahip değildiler. İkinci BT, strok başlangıcından 7 gün sonra, infarkt sahasını belirlemek amacıyla çekildi. On hastada infarkt, subkortikal; 15 hastada kortikal yerleşimliydi. Her iki infarkt tipine sahip olan hastalar da kortikal infarkt subgrubu içinde değerlendirildiler. Diabetes mellitusu, böbrek yetmezliği, enfeksiyonu ve kardiyak iskemisi bilinen stroklu hastalar çalışma kapsamına alınmadı. Kontrol grubu benzer yaş dağılımına sahip 20 sağlıklı subjeden oluşmuştu (yaş ortalaması 51,5; yaş alt-üst değerleri 38-68 yıl idi).

Kan Örnekleri

Venöz kan örnekleri 10 hastada ilk 24 saat içinde, 15 hastada ise 24-72 saatler arasında 1 mg/mL EDTA ve 500 kIU/mL içeren silikonize tüplere alındı. Tüpler soğutucu santrifüjle 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazma ölçüm gününe kadar "deep-frez" de -70° C'de bekletildi.

Plazma ET'1in Ölçümü

Plazma ET'1 düzeyleri " Endotelin-1, 2 [125] assay system code RPA 545 " kiti ile ölçüldü (Amersham International pic. UK). Dondurulmuş örnekler +4°C'de çözülür. ET-1'in plazmadan ekstraksiyonu için, 1mL plazma 2 M 0.25 mL HCL ile asidifiye edilerek santrifüj edildi; daha önceden hazırlanmış kolonlara (Amersham's Amprep 500 mg C2 columns, code RPN 1913) 5 mL/dakika'dan düşük akış hızlarında tatbik edildi. Kolonlar %0.1

trifluoroasetik asit (TFA) ile yıkandıktan sonra 2mL %80 metanol (%0.1 içinde) kolonlara uygulanarak eluatlar polipropilen tüplere toplandı. Azot gazı ile yıkandıktan sonra rezidüel 250 µL tampon çözeltisi ile çözüldü. Standart ve örneklerden 100'er µL alınarak her bir tüpe [total sayım (TC) ve nonspesifik bağlanma tüpleri hariç] anti-endotelin serumu eklendi. Tüpler iyice karıştırılarak +4°C'de 24 saat inkübe edildi. TC tüpü hariç diğer tüplere 250 mL donkey anti-rabbit serumu ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler +4° C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım döküldü ve herbir tüpteki radyoaktivite otomatik Gamma sayıcıda sayıldı. Değerler pg/mL olarak elde edildi. Bu ölçümde antiserumun cross reaktivitesi %100, ölçülebilir en düşük miktar 0.5 pg/tüp idi.

İstatistiksel Analiz

Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel hesaplamalar için " SPSS for Windows 5.0 " paket bilgisayar programı kullanıldı. Farklı grupların ortalamaları arasındaki farkın değerlendirilmesi için Student's t testi uygulandı. $p < 0.05$ fark anlamlı kabul edildi. Ayrıca korelasyon için linear regresyon analizi kullanıldı.

Sonuçlar

Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. ET-1 düzeyleri hastalarda (5.04 ± 1,92 pg/mL) kontrol grubuna göre (2.60 ± 0.44 pg/mL) belirgin olarak yüksekti ($p < 0.001$). İlk gün içinde ölçülen ET-1 düzeyleri (6.22 ± 1,63 pg/mL) 24 saat sonra ölçülenlerden (4,25 ± 1.70 pg/mL) anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.05$). BT'de ağır nörolojik defisit gösteren 16 hastanın 9'unda kortikal, 7'sinde subkortikal; ılımlı nörolojik defisit gösteren 9 hastanın 3'ünde subkortikal, 6'sında kortikal infarkt belirlendi. Kortikal (5.11± 2.45 pg/mL) ve subkortikal (5.46± 1.16 pg/mL) infarktlı ağır nörolojik defisitli hastalar (5.27 ± 1.90 pg/mL), kortikal (4.88± 2.24 pg/mL) ve subkortikal (3.95± 1.90 pg/mL) infarktlı ılımlı

nörolojik defisitli hastalardan (4.61 ± 2.03 pg/mL) daha yüksek ET-1 düzeylerine sahiptiler. Ancak bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Tüm kortikal infarktlı hastaların ET-1 düzeyleri (4.99 ± 2.34 pg/mL), tüm subkortikal infarktlı hastaların ET-1 düzeylerinden (4.70 ± 1.53 pg/mL) farklı değildi ($p > 0.05$). ET-1 ölçümleri sırasında ortalama tansiyon arteriyel değerleri hastalarda 151 ± 11.19 mmHg, kontrollerde 143 ± 12.60 mmHg idi. Her iki grupta, ET-1 düzeyleri ile yaş ve tansiyon arteriyel değerleri arasında anlamlı bir ilişki yoktu ($p > 0.05$).

Tartışma

Bu çalışma gösterdi ki, akut iskemik strok ET-1 düzeyinin belirgin yükselmesiyle assosiye olmaktadır. Bu yükseliş, strok başlangıcından sonraki 24 saat içinde en yüksek değerlere çıkmakta ve nörolojik tablonun ağırlığı ile korrele olmaya eğilimlidir. Plazma ET-1 düzeyinde strokun yol açtığı yükselmenin nedeni yeterince açıklanamamıştır. Bu fenomen, akut serebral infarktla bir arada olan genel strese (8) bir tepki olarak sistemik vasküler endotelyumun ürettiği ET-1'in non-spesifik yükselmesini yansıtabilir. Örneğin, epinefrinin ET-1 salınımını artırdığı bilinmektedir. Kortikal ve subkortikal infarktlı hastalarda ET-1 düzeylerinin birbirine benzemesi, bu ihtimali destekleyebilir. Alternatif olarak; plazma ET-1 düzeylerinde gözlenen bu yükselme, santral sinir sisteminden de kaynaklanmış olabilir. Çünkü infarkt sahasında sadece nöronal doku değil, o bölgenin damarları da hasara uğramaktadır. Bu iskemik olayın meydana getirdiği serebral mikrodamarların endotel hücre hasarı, ET-1'in üretimini ve/veya salınımının artışına yol açabilir. Nitekim hipoksinin ET-1 sentezini stimule ettiği bilinmektedir (10). Ayrıca, endotel hücreleri üzerindeki basıncın azalmasıyla birlikte perfüzyon basıncındaki düşüşün, ET-1'in üretimini artmasına neden olduğu gösterilmiştir (3). Bundan başka, iskemik bölge içinde artmış trombin konsantrasyonu ET-1 salınımının artışına katkıda bulunabilir (11). ET-1 çok güçlü bir vazokonstriktördür. Onun etkisi, angiotensin II, vazopressin yada nöropeptid y'nin gücünden 10 kez fazladır (3). Serebral damarlar ET-1'e çok daha hassastırlar. ET-1'in in vivo intrasisternal enjeksiyonu ağır ve çok uzun süreli baziler arter kontraksiyonuna neden olur (12). Muhtemeldir ki, artmış periferik plazma ET-1 düzeyleri, serebral infarkt bölgesinde yükselmiş endotelin düzeylerini yansıtmaktadır. Endotelyum iç yüzeyinde ve düz kas hücre tabakalarındaki ET-1 konsantrasyonunun, kan dolaşımındaki düzeylerden daha yüksek olduğu bilinmektedir (11, 13). Dolaşımdaki endotelinin biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiştir ve endotelial zedelenme kan damarlarının ET-1'in vazokonstriksiyon etkisine

duyarlılığını potansiyelize eder (14,15). Artmış ET-1 düzeyleri, hasara uğramış nöronal doku için tahrip edici olabilir. Bu durum, yükselmiş plazma ET-1 düzeyleri rapor edilmiş myokard iskemisindeki değişikliklere benzer (8,15). Esas olarak, ET-1 kollateral damarlarda konstriksiyona ve böylece bölgesel kan akımının azalmasına, infarkt dokusunun boyutunun artmasına ve nörolojik gidişin kötüleşmesine yol açacak kısır bir döngüye neden olabilir.

Sonuç olarak, bu güçlü vazokonstriktör peptidin aktivite ve üretimini modifiye edebilecek farmakolojik stratejilerin geliştirilmesi, beyin iskemisinin zararlı sonuçlarını önlemede yararlı olabilir.

Kaynaklar

1. Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. *J Clin Invest* 1989; 83 336-342.
2. King AJ, Benner BM, Andersoj S. A potent renal and systemic vasoconstrictor peptid. *Am J Physiol* 1989; 256(6): 1051-1058.
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (London)* 1988; 332: 411-415.
4. Hashim MA, Tadeballi AS. Hemodynamic responses evoked by endothelin from central cardiovascular neural substrates. *Am J Physiol* 1992; 262(1) : 1-9.
5. Hagiwara H, Nagasawa T, Yamamoto T, Lodhi KM, Ito T, Takemura N, Hirose S.
6. Immunochemical characterization and localization of endothelin ETB receptor. *Am J Physiol* 1993; 264 (4) :777-783.
7. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaki T, Takakura K, Murota S. Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 1990; 81:553-554. Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C, Salford LG. Endothelin is a potent constrictor of human intracranial arteries and veins. *Blood vessels* 1989; 26:249-253.
8. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; 2:53-54.
9. Robert C, Vladimirov CH, Bette LS, John WN, Christina W. The canadian neurological scale: A preliminary study in acute stroke. *Stroke* 1986;17:731-737.
10. Highsmith RF, Pang DC, Rappoport RM. Endothelial cell-derived vasoconstrictors:

- Mechanisma of action in vascular smooth muscle. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13 (5): 36
11. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of vascular endothelium. N Engl J Med 1990; 323:27-36.
 12. Mima T, Yanasigawa M, Shigeno T, Saito A, Goto K, Takakura K, Masaki T. Endothelin acts in feline and canine cerebral arteries from the adventitial side. Stroke 1989; 20:1553-1556.
 13. Hartter E, Woloszewicz W: Radioimmunoassay of endothelin. Lancet 1989; 1: 909.
 14. Stewart DJ, Baffour R. Functional state of the endothelium determines the response to

- endothelin in the coronary circulation. Cardiovasc Res 1990; 24: 7-1
15. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991; 18 :38-43.

Yazışma Adresi:
Dr. Orhan DENİZ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fak.
Nöroloji Anabilim Dalı
Erzurum