

Adenozinin Geçici Orta Serebral Arter İskemisindeki Nöroprotektif Etkisi

Neuroprotective Effect of Adenosine on Transient Middle Cerebral Artery Occlusion

Fatih EKİCİ, Ayşe KARSON, Nurbay ATEŞ

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyoloji AD, İzmit

ÖZET: Adenozin, santral sinir sisteminde yer alan endojen inhibitör bir nöromodulatördür. Adenozinin iskemi sırasında artan eksitator amino asit (EAA) salınımını azalttığı ve nöronları oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu sebeple serebral iskemi tedavisinde adenozin kullanımı, sadece EAA reseptör antagonistleri yada radikal süpürücülerle tedaviye göre iskemik hasarın önlenmesinde daha faydalı olabilir.

Bu çalışmada; adenozin tedavisinin etkisi sıçanlarda orta serebral arter iskemi-reperfüzyonu (MCAO/R) oluşturularak değerlendirildi. MCAO/R, intraluminal iplik modeliyle 90 dk orta serebral arter oklüzyonu oluşturuldu daha sonra iplik geri çekilerek reperfüzyon sağlandı. Bir gün sonra dekapite edilen sıçanların beyin kesitleri alındı. Bu kesitler 2-3-5 triphenyl tetrazolium chlorid (TTC) ile boyandı. Görüntüler Adobe Photoshop programıyla değerlendirildi ve toplam infarkt alanı, aynı beyin hemisferinin toplam alanına oranlandı.

Sonuçlarımız, adenozinin MCAO/R'de iskemik alan oranlarını belirgin şekilde azalttığını göstermektedir, dolayısıyla adenozin geçici fokal serebral iskemide nöronal koruyucu etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Adenozin, TTC, serebral iskemi

ABSTRACT: Adenosine is an endogenous inhibitory neuromodulator in central nervous system. Studies have shown that adenosine inhibits the ischemia-evoked release of excitatory amino acids (EAA) and protect the neurons against oxidative stress. Therefore, adenosine could be more beneficial than an EAA receptor antagonist or free radical scavenger used alone in treatment of cerebral ischemia.

In the present study, the effect of adenosine treatment was evaluated by middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO/R) in rats. MCAO/R was performed by intraluminal suture model for 90 min and then the suture was withdrawn to permit reperfusion. After 24 hours, the rats were decapitated and coronal brain slices were obtained. These slices were stained with 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). The images were analyzed by Adobe Photoshop program and total area of infarction was expressed as a percentage of total area from the ipsilateral hemisphere.

Our results have shown that adenosine effectively decreased infarct size on MCAO/R, therefore it might be neuroprotective on transient focal cerebral ischemia.

Key Words: Adenosine, TTC, cerebral ischemia

GİRİŞ

Serebral iskemiyeye maruz kalan nöronlarda geri dönüşümsüz ve ölümcül hasar oluşmakta ve takibinde eğer reperfüzyon gerçekleşmişse özellikle oksijen radikallerine bağlı bu hasar daha da artabilmektedir. İskemi ve reperfüzyonda oluşan nöronal harabiyetin fizyopatolojisinde birçok etken sayılmakla birlikte, en önemlileri olarak eksitator amino asit salınımı ve serbest radikallerin oluşturduğu mekanizmalar kabul edilmektedir (1,2).

Adenozin, santral sinir sisteminde yer alan inhibitör bir nöromodulatördür. Beyin iskemisi ve reperfüzyonu sırasında oluşan metabolik stres ve

ATP azalması endojen extrasellüler adenozin seviyesini artırır ve nöroprotektif etki oluşmasını sağlar. Bu nöronal korunmanın mekanizması tam olarak açık olmasa da yapılan çalışmalarda, adenozinin iskemi sırasında artan eksitator amino asit (EAA) salınımını azalttığı ve serbest radikallerin oluşturduğu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Adenozin bu çift yönlü etkisinden dolayı, sadece EAA reseptör antagonistleri yada radikal süpürücülere göre iskemik hasarın önlenmesinde daha faydalı olabilir (3,4). Sıçanlarda gerçekleştirilen orta serebral arter oklüzyonu ve takibinde oluşturulan reperfüzyon (MCAO/R) modeli, insanda meydana gelen inmelere benzeyen bir model oluşturmakta, bu nedenle de birçok araştırmada tercih edilmektedir (5).

Bu çalışmada; adenozinin, sıçanlarda oluşturduğumuz geçici orta serebral arter iskemi (MCAO/R) modelinde nöronal hasara olası etkisini

araştırmayı planladık, oluşan hasarı göstermek için de yine çok yaygın olarak kullanılan 2-3-5 triphenyl tetrazolium chlorid (TTC) boyasından yararlandık (6).

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyssel çalışmamıza Kocaeli Üniversitesi Etik Komitesi onayı alındıktan sonra başlanmıştır. Çalışmamızda ağırlıkları 200-300 gr arasında erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Çalışma boyunca hayvanlar 12'şer saatlik aydınlık ve karanlık periyotlarda tutuldu, yiyecek ve su alımları serbest bırakıldı. Anestezi sağlamak için dietil eter kullanıldı ve vücut iskemi boyunca ısıtıcı lamba ile ısıtılıp rektal ölçümle takip edilerek 37 ± 1 °C'de tutuldu. Orta serebral arter iskemisi oluşturmak için intraluminal sutür modeli uygulandı (5).

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

A) Hiçbir işlem yapılmayan sıçanların beyin kesitleri 2-3-5 triphenyl tetrazolium chlorid (TTC) boyasıyla boyanıp hasarsız beyin görüntüsü fotoğraflandı.

B) İskemi + reperfüzyon grubu (kontrol grubu): İntraluminal sutür modeli kullanılarak oluşturulan 90 dakikalık orta serebral arter iskemisini takiben reperfüzyon yapılan sıçanlar 24 saat sonra dekapite edilerek 2mm beyin kesitleri alınıp, TTC ile boyandı. Kesitler %2'lik 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) boyası içinde 37 °C'de, karanlıkta, 20 dk bekletildi (TTC boyası, pH 7.4 olan fosfat tamponu içinde çözülürülerek hazırlandı). TTC boyası iskemik alanlarda tutmadı, diğer alanları ise kırmızıya boyadı. Digital kamera ile çekilen fotoğraflar bilgisayara aktarıldı. Adobe photoshop programı yardımıyla infarkt alanlarının ve sağ hemisferin total piksel değerleri (bu alanın kaç piksel içerdiği) ayrı ayrı hesaplandı, infarkt alanı sağ hemisferin tüm alanına oranlanıp yüzde (%) olarak ifade edildi (9).

C) İskemi-reperfüzyon + adenosin çözücüsü verilen grup (sham grubu): Adenosinin çözücüsü olan 8% Tween 20 solüsyonu iskemiden hemen önce intraperitoneal (İP) verildi. 90 dk MCAO/R uygulandıktan 24 saat sonra aynı işlemlerle infarkt alanı hesaplanıp aynı beyin hemisferine oranlandı.

D) İskemi-reperfüzyon + Adenosin grup: 8% tween-20 solüsyonunda çözülürülen adenosine (sigma) iskemiden hemen önce 500 mg/kg İP dozunda verildi (3). 90 dk MCAO/R uygulandıktan 24 saat sonra aynı işlemlerle infarkt alanı hesaplandı ve aynı beyin hemisferine oranlandı.

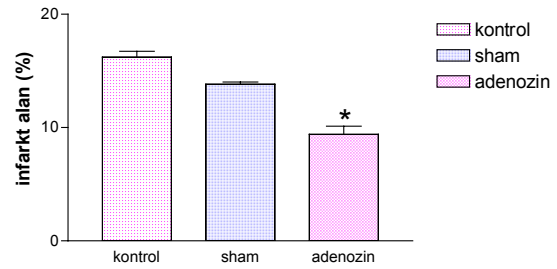
Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

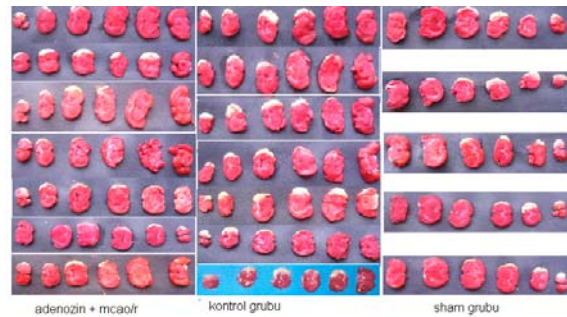
MCAO/R modeli uygulanan tüm sıçanlarda, reperfüzyon oluşturduktan bir gün sonra yapılan dekapitasyon işleminden sonra alınan beyin kesitlerinin TTC ile boyanması sonucunda; belirgin olarak frontal, temporal, paryetal korteks ve daha az olarak da corpus striatum gibi beyin alanlarında iskemik hasar tespit edildi. 500 mg/kg, İP Adenosin uygulanan grupta ise bu bölgelerdeki hasarın belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$), sham grubunda ise anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 1, Şekil 1-2-3).

Tablo 1. Sağ MCAO/R oluşturulmadan hemen önce verilen 500mg/kg İP adenosinin iskemik alan oranları üzerine etkisi. Değerler ortalama \pm SE olarak verilmiştir.

Gruplar	N	İskemik alan (%)
Kontrol	7	16.23 \pm 1.38
Sham	5	13.80 \pm 0.53
Deney	7	9.45 \pm 1.91



Şekil 1. Geçici orta serebral arter iskemisi uygulanan sıçanlarda adenosin kullanımı infarkt alanları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturmuştur (* $P < 0.05$).



Şekil 2: Kontrol grubu, sham grubu ve adenosin verilen gruplardaki tüm sıçanların beyin kesitlerinin TTC ile boyanması sonucu elde edilen görüntüler.



Şekil 3. 2 mm'lik kesitlere ayrıldıktan sonra TTC boyası ile boyanmış beyin kesitlerinde, boyanın tutmadığı iskemik alanlar beyaz olarak görünmekte. **a)** MCAO/R + adenozin verilen grup, **b)** Sadece MCAO/R yapılan grup (kontrol grubu).

TARTIŞMA

Sonuçlarımız; adenozinin, sıçanlarda oluşturulan geçici orta serebral arter iskemisi (MCAO/R) modelinde meydana gelen nöronal hasara karşı nöroprotektif etkili olduğunu göstermektedir.

Adenozinin, muhtemelen iskemide artan EAA salınımını inhibe ederek ve radikal süpürücü etki göstererek, beyinde iskemide reperfüzyon hasarına karşı nöroprotektif etkili olduğu belirtilmektedir (7,8).

Bizim çalışmamızda da adenozin kullanımıyla iskemik alan oranı azalmış ve adenozinin koruyucu etkisi gösterilmiştir, bu sonuç önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yukarı da sayılan mekanizmalara ek olarak adenozinin periferik etkileri de mevcuttur. Bununla ilişkili olarak, adenozinin hipotermi oluşturucu etkisinin nöronal korunmaya katkıda bulunduğu belirtilmektedir (2,4). Bu çalışmada kontrol grubu ile deney grubu arasındaki vücut ısı farkı olmaması için iki grupta da 37 ± 1 °C'de tutulmaya çalışılmıştır. Eğer adenozin verilen grupta vücut ısısı yükseltilmeseydi infarkt alanı daha da azalabilirdi. Adenozinin, vücut ısısını koruduğumuz halde nöronal hasarı azaltması bize eksitatoksik hasara ve oksidatif strese karşı bilinen etkilerinin kayda değer bulunduğunu göstermektedir (7,8). Diğer periferik etki hipotansiyon oluşumu ise, serebral kan akımını daha da azaltarak iskemik hasarın artmasına neden olabilmektedir. Bu etki adenozin kullanımını kısıtlayan önemli bir sorun teşkil etmektedir (2,4).

İnsanda oluşan iskemik inme durumlarında, çoğunlukla bir müddet sonra ya kendiliğinden ya da trombolitik tedaviyle reperfüzyon sağlanmaktadır. Hayvan deneylerinde bu duruma benzerlik gösteren, çeşitli şekillerde yapılabilen MCAO/R modelleri kullanılmaktadır. Bunların arasında da intraluminal iplik modeli; diğerlerine göre daha az invaziv olması ve kolaylıkla reperfüzyon oluşturulabilmesi nedeniyle en çok tercih edilen yöntemdir. Bu avantajları düşünülerek çalışmamızda bu metod kullanılmıştır.

Ayrıca TTC boyasıyla infarkt bölgelerinin tespiti de, araştırmalarda yaygın şekilde kullanılan bir yöntem olması nedeniyle tercih sebebimiz oldu. Ancak olanaklarımız olsa daha hassas ve daha erken infarkt tespiti yapılabilen PET, SPECT, fMRI gibi görüntüleme teknikleri kullanmayı tercih ederdik.

Netice olarak; MCAO/R oluşturulan sıçanlarda adenozin kullanımı infarkt alanını azaltmıştır, bu sonuç adenozinin geçici fokale iskemide nöroprotektif etkili olabileceğini göstermekte ve daha önceki çalışmaları desteklemektedir.

İleriki çalışmalarda, adenozin ve kan basıncını düzenleyici tedavi protokollerinin birlikte kullanılmasıyla daha ümit verici sonuçlar alınabileceğini tahmin etmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Chan PH. Role of oxidants in brain damage. *Stroke*, 1996; 27: 1124-1129.
2. Dag KJE von Lubitz. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of brave concept? *European Journal of pharmacology*, 1999; 371: 85-102.
3. Gupta YK, Sinha K, Chaudhary G et al. Protective effect of adenosine against neuronal injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats as evidenced by diffusion-weighted imaging. *Phar. Bioc. and behavior*, 2002; 72: 569-574.
4. Mendonca A, Sebastiao A M, Riberio J A. Adenosine: does it have neuroprotective role after all? *Brain Research Reviews*, 2000; 33: 258-274.
5. Koizumi J, Yoshida Y, Nazakawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, 1986; 8: 1-8.
6. Zhong P, Pang SF and Cheung RTF. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res*, 2002; 32: 168-172.
7. Masino SA, Mesches MH, Bickford PC et al. Acute peroxide treatment of rat hippocampal slices induces adenosine mediated inhibition of excitatory transmission in area CA1. *Neurosci lett*, 1999; 274: 91-97.
8. Yavuz O, Turkozkan N, Bilgehan A et al. The effect of 2-chloroadenosine on lipid peroxide level during experimental ischemia-reperfusion in gerbils. *Free Radical Biol Med*, 1997; 22: 337-341.
9. Usborne K A, Shinego T, Balarski AM. Quantitative assesment of early brain damage in rat model of focal cerebral ischemia. *J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1987; 50: 402-410.