

İSKEMİ/REPERFÜZYON ZEDELENMESİNDE INTRA ARTERİYEL VERİLEN DIMETİLSÜLFOKSİTİN ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ BÖLÜM - III

Metin Atasoy*

Ümit Kaya**

R. Hazıroğlu***

Nihat Egemen****

Normalde hücrede O₂ redüksiyonu sırasında hidroksi radikal, süperoksit radikal ve hidrojen peroksit gelişmekle beraber vücuttaki enzimler bu maddelerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadırlar (8). İskemi ve sonra reperfüzyon sırasında ise şekil - 1'de gösterildiği üzere süperoksit radikal ve hidroksi radikal miktarları önemli derecede artmaktadır. Hidroksi radikaller Fe⁺⁺⁺'ün katalizör etkisi ile (Haber-Weiss reaksiyonu), (şekil - 2) iki aktif O₂, süperoksit radikal ve hidrojen peroksitten gelişirler. Yaşayan hücrede bulunan her molekülle (DNA, Protein, Karbonhidrat dahil) reaksiyona girerler. Bu olayın demirden zengin beyinde daha belirgin olabileceği bildirilmiştir (7). Genelde serbest radikaller dış yörüngelerindeki eşleşmiş elektronlarından dolayı eğer radikal yakalayıcılar tarafından tutulmazlarsa vasküler, biokimyasal ve yapısal sistemlerde bir dizi zincirleme kimyasal reaksiyona girerek, kapiller geçirgenliği artırır ve doku nekrozuna yol açarlar. Trombosit ve nötrofil adezyonuna ve mikrosirkülasyonda tıkanmalara neden olurlar. Hücre zarında zedelenme ile doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna ve sonunda hücre ölümüne yol açarlar (1,4,8).

Serebral küçük damarlarda prostoglandin (PG) 12, PG F₂₀, ve tromboxane A₂ (TX A₂) sentez edilmektedir (15). Prostoglandin ve tromboxane (PG - TX) sisteminin ve trombositlerin serebral iskemide önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (3,6,9,15). Pg - TX sistemini etkileyen ilaçlar iskemi olayını da etkilemektedirler (3,15).

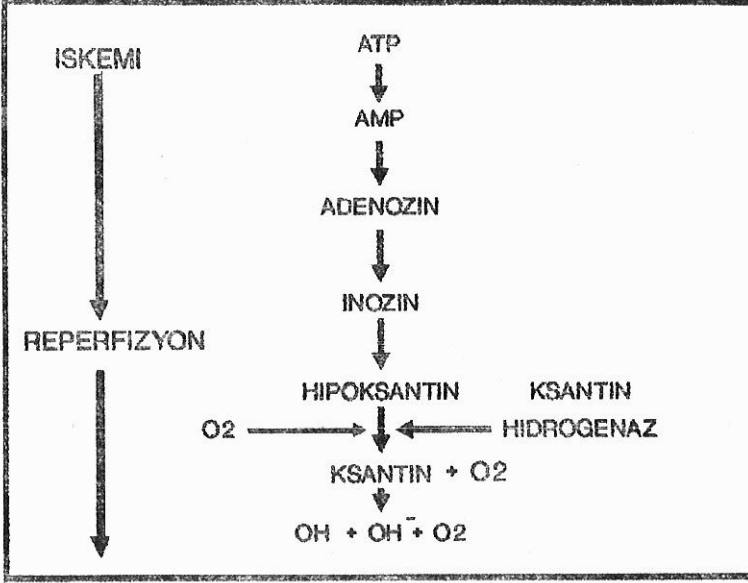
* A.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

** A.Ü. Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi.

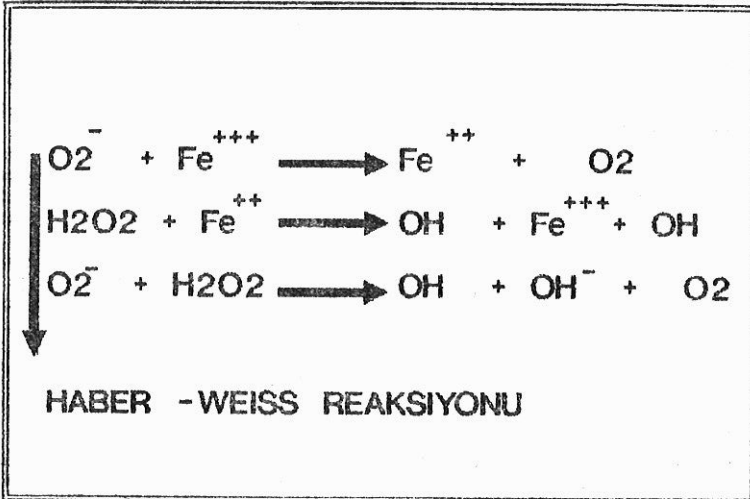
*** A.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

**** A.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

---+--- Bu çalışma Ank. Üni. Tıp Fakültesi Nöroşirürji Deney Lab. yapılmıştır.



Şekil 1 - Serbest radikal oluşumu.



Şekil 2 - Hidroksi radikal oluşumu.

DiMethylSülfoxide (DMSO) (C₂ H₆ O S) renksiz kendine has koku olan su ile karışabilen organik bir çözücüdür, deri ve biyolojik membranlardan kolayca yayılır, topikal uygulandığında 5 dakikada deride 20 dakikada iç organlarda bir saat sonrada kemikte saptanabilir (13,14). DMSO dipolar bir yapıya sahiptir, böylece hidrojen bağları ve suya karşı ve ayrıca metal anyon, doku komponentleri, proteinler, yağlar ve çeşitli ilaçlarla kompleks yapma özelliği vardır (6,13, 16,19). Doymamış sülfür atomu özelliği ve metil grubundaki hidrojen atomlarını kullanabilme özelliği ile güçlü bir serbest radikal yakalayıcısıdır (2,19). Ayrıca DMSO prostaglandin inhibitörüdür. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu, hücre membran içeriklerinin korunması, mitokondrial oksidatif fosforilasyonda gelişmeye neden olduğu bildirilmektedir (2,3,10,17). DMSO nun bütün bu özelliği nedeniyle iskemi/resirkülasyon zedelenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (2,3,10,17).

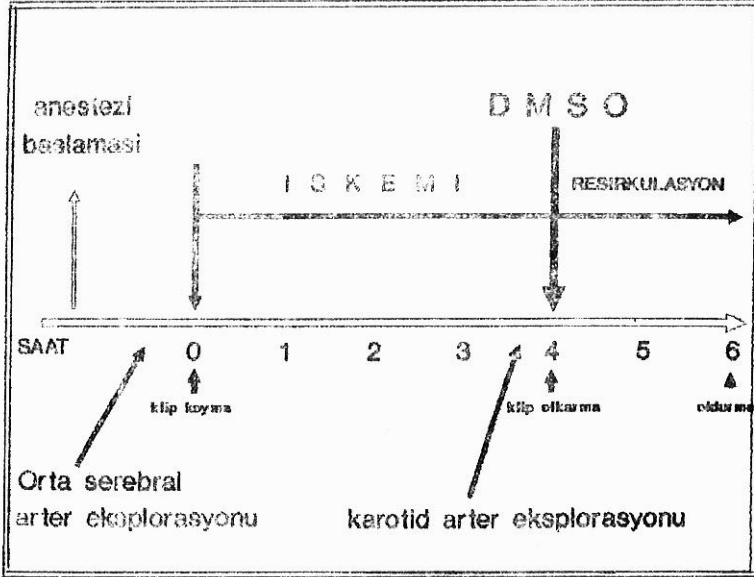
DMSO'nun sistemik yolla kullanılmasının iskemiye azalttığına dair bir çok yayın bulunmaktadır (3,10,17). Buna karşın resirkülasyonla beraber direkt olarak lezyon bölgesine etkisi konusunda yayın bulunmamaktadır. Bu deneyde DMSO iskemi sonrasında resirkülasyonla beraber intra arteriyel olarak kullanılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada ağırlığı 2.5 - 3.5 kg arasında değişen Yeni Zellanda beyaz tipi her iki cinsten 14 tavşan kullanılmıştır. Tavşanlar Rompun (Xylasin hidro klorür) 0.15 ml/kg ve takiben 0.5 mg/kg ketamin hidroklorür (Parke Davis, ketalar) ile başlayarak gerektiğinde 0.5 mg ketalar tekrar verilecek biçimde uyutulmuşlardır.

Daha önceki yazılarda tanımlanan biçimde (Bölüm-1, Bölüm-2) tavşan orta serebral arterine geçici klip yerleştirilmiştir. 4 saat sonra klip alınmış ve resirkülasyonla beraber intra arteriyel olarak % 20 DMSO (Merk, Demetylsulfoxide) 500 mg/kg verilmiştir. Intra arterial vermek için eksternal karotit arterden bir kateter ana karotis artere doğru yerleştirilmiştir. Eksternal karotit arterler bağlanmış, kateterin yerinde olduğu ve verilen maddenin internal karotis artere gittiği boyun ve yüz kaslarında kasılma olmaması ile de teyit edilmiştir. DMSO verilmeye başlanmasıyla beraber DMSO'nun korteks arterleri üzerine olan etkisi mikroskop altında (Büyütme 25x) gözlenmiş ve fotoğraf çekilmiştir.

Klip alındıktan 2 saat sonra tavşanlar intra kardiyak yüksek doz potasyum klorür (KCl) verilerek öldürülmüşlerdir. Beyinler çıkarılarak makroskopik inceleme yapılmış optik kiazmanın hemen önünden yapılan koroner kesitlerde resim çekildikten sonra, beyinler histolojik inceleme için % 10'luk formole konmuşlardır. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4-6 mm lik kesitler hematoksilin eozin ile boyanarak histolojik inceleme yapılmıştır (Şekil - 3).



Şekil 3 - Deney protokolü.

BULGULAR

İntra arteriyel olarak verilen DMSO'nun doz ayarlanması sırasında 3 tavşan aşırı doz nedeniyle kaybedilmiştir. Başlangıçta kg başına 2 gr/kg % 20 lik DMSO kullanılmış. Tavşan apnea nöbetine girerek kaybedilmiştir. Bunun üzerine doz yarıya indirilmiş, bu sefer tavşanda apnea nöbetleri, konvülsiyonlar, kan basıncında yükselme ve taşikardi gelişmiş ve tavşan kaybedilmiştir. Doz tekrar yarıya indirilmiş 500 mg/kg ile tavşanlarda yukarıda belirtilen bulgular görülmemiş ve deneye bu doz ile devam edilmiştir.

Kortikal damarların mikroskopik gözlemlerinde damarlarda dolgunluğun ilacın verilmesiyle başladığı ve bunun bir saat boyunca devam ettiği görülmüştür (Resim - 4).

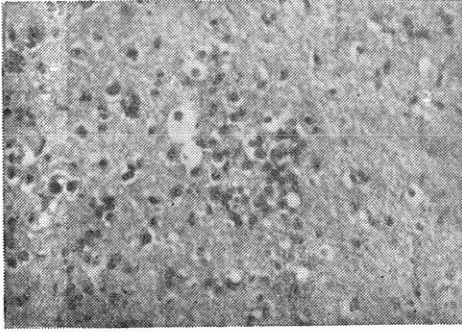


Şekil 4 : DMSO verildikten hemen sonra orta serebral arterin görünümü.

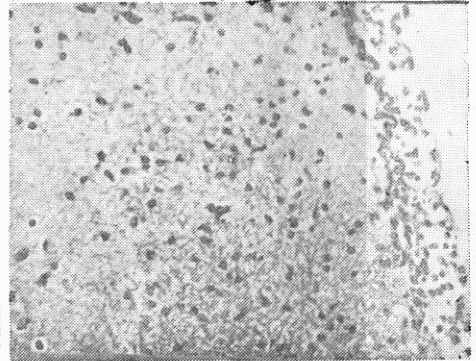
Optik kiazmanın hemen önünden yapılan koroner kesitlerin makroskopik incelemelerinde, hem kontrol grubu hem de DMSO verilen grublarda, lezyon olmayan taraf tamamen normal olarak tesbit edilirken, lezyon olan tarafta ve özellikle orta serebral arter dağılım alanında ödem tesbit edilmiştir, herniasyon ve aşırı kanama bulgularına rastlanılmamıştır.

Histopatolojik incelemelerde, kontrol grubunda amygdaloid anterior, pars posterior, centralis ile hippocampusun stratum molekulare ve stratum granulosum tabakaları ayrıca areae dentatae bölge-

lerinde ve orta serebral arterin beslediği korteksin orta ve derin tabakalarındaki nöronlarda çeşitli değişiklikler tesbit edilmiştir. Bu değişiklikler başlıca piknotik nükleus ve sitoplazmada eozinofilik shrinkage'i kapsamaktadır. Bütün bu değişiklikler DMSO verilen grublarda nisbeten daha az oranlarda görülmüştür (Resim - 5 a,b). Sonuçlar tablo - 1'de gösterilmiştir.



Şekil 5 - a : Kontrol grubundaki nöronal değişiklikler.



Şekil 5 - b : DMSO verildikten sonra nöronal değişiklikler.

Kontrol grubunda diffüz reaktif gliosis neutrophille beraber çok belirgin olarak görülürken, DMSO ile tedavi edilen deneklerin yarısında bu reaktif gliosisin kaybolduğu ve geri kalanlarda ise çok az nisbette görüldüğü tesbit edilmiştir.

Yine kontrol grubunda ,özellikle kortikal alanlarda (gri cevherde) multi fokal spongiosis açıkça belli olurken, DMSO verilen hayvanların yarısında bu lezyonlar kaybolmuş diğer yarısında ise daha az oranlarda görülmüştür.

DMSO ile tedavi edilen grupta en fazla etki trombus oluşumu üzerinde görülmüştür. Deneklerin yarısından fazlasında trombus oluşumuna rastlanmamış, geri kalanlarda ise daha az oranlarda görülmüştür. Kontrol grubunda arteriollerdeki trombus oluşumu belirgin değildir. Kontrol grubunda arteriollerdeki trombus oluşumu belirgin değildir.

Meningeal ödem, eritrositlerin ekstrasvazasyonu ve neutrophillerin oluşumu kontrol grubunda tüm boyutlarıyla gözlenirken, burada DMSO'nun etkisinin nisbeten az olduğu göze çarpmaktadır.

DMSO'nun etkisinin en fazla görüldüğü durumlardan biri de neuropillerdeki hemorajidir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fark açık bir şekilde görülmektedir.

Sonuçlar toplu olarak tablo - 2'de görülmektedir.

Tablo 1 - Orta Serebral Arter Dağılım alanında görülen nöronal değişiklikler.

Bölgele Denekler		Amygdoloid Nükleuslar (1,2,3)	Hippocampus Bölgeler (a,b,c)	Kortikal Derin ve Orta Nöronlar
Kontrol (n = 5)	R	++	++	++
	L	—	—	—
1. Denek	R	++	++	++
	L	—	—	—
2. * Denek	R	+++	+++	+++
	L	—	—	—
3. Denek	R	++	++	—
	L	—	—	—
4. Denek	R	++	++	++
	L	—	—	—
5. Denek	R	++	++	++
	L	—	—	—
6. Denek	R	++	++	++
	L	—	—	—

(R = Sağ hemisfer, L = Sol hemisfer, (—) Nöronal değişiklik yok (=) Piknotik Nükleus veya stoplazmik değişiklik, (++) Piknotik Nükleus ve stoplazmik değişiklik, Amygdoloid Nükleuslar 1 — Pars anterior, 2 — Pars lateralis, 3 — Pars santralis, Hippocampal bölgeler a — Stratum molekulareea area dentate, b — Stratum granulosum area dentate, c — Hilus fascia dentate).

* — Bu denekte Ensefalozoon enfeksiyonu tesbit edilmiştir.

Tablo 2 - Diğer histopatolojik sonuçların toplu sonuçları görülmektedir.

Lezyon Denekler		Yaygın			Meningeal	Nörofilde
		Gliososis	Spongiosis	Trombus	Ödem	Hemoraji
Kontrol (n = 5)	R	+++	++	++	+++	+++
	L	—	—	—	—	—
1. Denek	R	—	—	—	+	—
	L	—	—	—	—	—
2. * Denek	R	—	+	—	+++	+++
	L	—	—	—	—	—
3. Denek	R	+	+	—	+	+
	L	—	—	—	—	—
4. Denek	R	—	—	—	+	—
	L	—	—	—	—	—
5. Denek	R	+	+	+	++	+
	L	—	—	—	—	—
6. Denek	R	+	—	+	+	—
	L	—	—	—	—	—

(—) Yok, (+) Hafif, (++) Orta, (+++) Şiddetli.

* Bu denekte *Nosema Cuniculi* Enfeksiyonu tesbit edilmiştir (Ensefalozoon Enfeksiyonu).

TARTIŞMA

İskemik zedelenme biokimyasal, vasküler ve morfolojik değişikliklerle gelişen dinamik bir süreçtir. İskemide kan akımındaki yetersizlikten dolayı nöronların elektrik aktivitesinde kısıtlama oluşur. İnter selüler hemostazis devam ettirilirken transmissionda zorluk ortaya çıkar. Nöron sitoplazmalarında ve diğer beyin hücrelerinde elektron lucensi iskemi ve kromatin yığılması ortaya çıkar. Bunun asidoz ve iskeminin en iyi belirtilerinden biri olduğu bildirilmektedir (11). Bu devredeki nöronal yapısal değişiklikler, ışık mikroskopisi çalışmalarında tesbit edilemez. Olay ilerler ve membran yetersizliği gelişirse potasyum iyonları (K+) hücre dışına çıkar, sodyum (Na+) ve kalsiyum (Ca++) iyonları ve su hücre içine girer. O zaman mikroskopide görülebilen değişiklikler ortaya çıkar (9,10,11). Sinir hücrelerinin sitoplazmaları belirginleşir. Mitokondrealarda şişme ve mikrovakuloizasyon görülür. Komşu astrositlerde belirgin şişme göre çar-

par. Total su alınımı fazlalaşır. Massif bir iyon transferi söz konusudur. Bizim deneyimizde kontrol grubu olarak kullandığımız iskemik değişiklikler bu devreyi kapsamaktadır.

İskemi zedelenmesinde en azından 3 önemli ana faktör bildirilmiştir. Bunlar calsiyum (Ca^{++}) serbestleşmesi, hidroksi radikallerin salınması ve tromboxan A₂ (Tx A₂), PG F₂₀ ve PGE₂ oluşumudur (1, 4,5,9,12). Kalsiyum sistemdeki serbest asitten aktif fosforilasyon sonucu ve trombositlerden salınmaktadır. Ayrıca nöronal terminallerden Noradrenalin salgılanmasını fazlalaştırır. Bu serbest damarlardaki alfa reseptörleri aktive eder vazokonstrüksiyonu fazlalaştırır. Kan akımı azalır ve O₂ alınımı düşer Tx A₂ kuvvetli vazokonstrüksiyona neden olur trombosit aggregasyonunu uyarır.

DMSO'nin ADP ve trombinle uyarılmış trombosit aggregasyonunu *invivo* olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. DMSO iskemi sonucu gelişen trombositleri de aggregate eder (3,6,18,20). Serebral iskemi trombosit abnormalitesine neden olur. Tedavinin yönlendirilmesinde bu nokta önemlidir (3). DMSO, kalp kası üzerine yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi, Ca^{++} üreten dejenerasyonu önlemektedir. DMSO ayrıca sinir dokusu hipoksisi ve şiddetli vazospazm sırasında ortaya çıkmış olan Ca^{++} 'un arteriolar düz kas üzerine olan miyo-kontraktıl etkisini de antagonize etmektedir (3). Burada DMSO'nun kalsiyum kanal blokörleri gibi hareket ettiği bildirilmiştir. Bu özelliği nedeniyle hipoksik hücreler veya trombositler tarafından salınan kalsiyumu antagonize ederek vazospazmı önlediği gösterilmiştir (5, 10,18,20). Trombositlerden salınan kollagenin de DMSO ile nötralize edilebildiği bildirilmiştir (13,15,20).

DMSO'nun hücre membranını koruyucu etkisi vardır. Burada kollajeni inhibe ederek trombosit yapışkanlığını önler, PG₁₂ salınmasına yardımcı olur ve vasküler endotelyumu koruyarak, trombosit yapışkanlığı azaltır. Bu özelliği nedeniyle DMSO grubunda, kontrol grubuna göre trombosit oluşumu belirgin bir azalma göstermiştir.

İskemiyi takiben hidroksi radikallerin biriktiği yerlerden biri mitokondriyalardır. DMSO efektif bir hidroksi radikal yakalayıcısıdır ve mitokondriyalardaki hidroksi radikallerin sitotoksik etkisini nötralize ettiği düşünülmüştür. DMSO mitokondrial oksidatif fosforilasyonu sağlar. Hücrede enerjinin kaynağı olan ATP aze aktivitesi, iskemi

sonrasında en çok etkilenen biokimyasal aktivitedir (4,9,11,12). DMSO submitokondrial parçacıklardaki ATP aze aktivitesini azaltarak hücre sel is kemi sırasındaki O₂ kullanımını azaltabilir (2,3,13).

DMSO'nun vasküler ve biokimyasal etkileri reseptörler, enzim sentezleri ve hücre sel sıvı değişimleri üzerine olurken, hücre membranı ve intrasellüler yapıları koruyan bir etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (3). Beyin ödeminin azaltılmasında direkt ve indirekt hidroksi radikal yakalayıcılarının önemli etkileri olduğu bildirilmektedir (8). Bütün bu özellikleri nedeniyle DMSO grubunda, kontrol grubuna göre nöronal değişiklikler, spongiosis, yaygın reaktif gliosis, meningeal ödem ve neuropillerde hemorajinin önemli derecede engellenmiş olduğu görülmüştür.

İntra arteriyel olarak verilen 1.5 mg/kg ve 1 gr/kg dozlardaki DMSO, tavşanların ölümüne yol açmıştır. Literatürde intra venöz olarak 2.5 gr/kg (% 50 lik) ve 3 gr/kg (% 20 lik) DMSO verilerek yapılan deneylerde, DMSO'nun rahatlıkla kullanıldığı bildirilmiştir (3,8, 10). Biz ilk kullandığımız dozu azaltarak, 500 mg/kg (% 20) lik dozun tavşanlar tarafından tolere edildiğini gördük. İntra venöz olarak verilen DMSO'nun iskemik dokuda koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir fakat intra arteriyel olarak resirkülasyondan sonra ne gibi etki yaptığına dair literatür bulamadığımızdan verilerimizi karşılaştıramadık.

Kullandığımız model ve yöntemde intra arteriyel olarak verilen DMSO'nun en azından belli sürede histopatolojik gelişmeye olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

ÖZET

Deney sel fokal serebral is kemi/resirkülasyon iskemisinde resirkülasyonla beraber intra arteriel olarak verilen DiMetil Sülfoksit (DMSO)'in lezyon bölgesine olan etkileri histopatolojik olarak incelenmiştir. Resirkülasyon periyodunda intra arteriyel olarak verilen DMSO'nun iskemik değişikliklerin azaltılmasında faydalı etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Serebral is kemi, DSMO, Resirkülasyon.

SUMMARY**Histopathological Evaluation of Intraarterial Dimethylsulfoxide in Ischemia/Reperfusion Injury. Part III.**

In the experimentally focal cerebral ischemia/recirculation ischemia, the effect of intra arterial administration of the DMSO during the recirculation period to the ischemic lesion field have been evaluated histopathologically, in rabbits. DMSO administered during recirculation period is found to be beneficial effect in reducing ischemia.

Key Words : Cerebral ischemia, DMSO, Recirculation.

KAYNAKLAR

1. Angel MF Ramesastry SS Swartz WM Basford RE and Futrell JW : Free Radicals. Concepts Concerning Their Chemistry, Pathophysiology and Relevance to Plastic Surgery. *Plast. Reconstruct. Surg.* 79 : 6 : 990-997, 1987.
2. Bolli R Zhu W : Hartley CJ Michael LH et al : Attenuation of Dysfunction in the Postischemic Stunned Myocardium by Dimethyl Urea. *Circulation* 76 : 458-468, 1987.
3. De La Torre JC : Dimethyl Sulfoxide in Prostaglandin-Tromboxane and Platelet Systems after Cerebral Ischemia. *Ann. NY Sci.*, 411 : 293-308, 1983.
4. Bulkley GB : Free Radical-Mediated Reperfusion Injury : A Selective Review : *Br. J. Cancer (Supp)* 8 : 66-73, 1987.
5. Demopoulos HB Flamm ES Pietronigro DD and Seligman ML : The Free Radical Pathology and the Microcirculation in the Major Central Nervous System Disorders. *Acta Physiol. Scand* 492 : 91-120, 1980.
6. Dujovni M Rozario R Dossofsky N Diaz FG and Segal R : Antiplatelet Effects of Dimethyl Sulfoxide, Barbiturates, and Methylprednisolone. *Ann NY Acad Sci.*, 411 : 2343-244, 1983.
7. Ikeda Y Anderson JH Long DM : Oxygen Free Radicals in the Genesis of Traumatic and Peritumoral Brain Oedema. *Neurosurgery* 24 : 679-685, 1989.
8. Ikeda Y and Kong DM : Comparative Effects of Direct and Indirect Hydroxyl Radical Scavengers on Traumatic Brain Oedema : *Acta Neuroch. (Supp)* 51 : 74-77, 1990.
9. Jerkins LW Povlishock JT Lewet W Miller JD Berker DP : The Role of Postischemic Recirculation in the Development of Ischemic Neuronal Injury Following Complete Cerebral Ischemia. *Acta Neuropathol.* 55 : 205-220, 1981.
10. Kedar J Jacop ET Bar-Natan N and Ravid M : Dimethyl Sulfoxide in Acute Ischemia of the Kidney. *Ann. NY Acad Sci.* : 41 : 131-134, 1983.

11. Kalimo H Paljarvi L Olsson Y Siesjö BK : Structural Aspects of Energy Failure States in the Brain. In Wiedemann K., Hoyer S. (eds). Problems and Perspectives of Brain Protection. Springer, Berlin Heidelberg, New York 1983, pp : 1-11.
12. Kalimo H and Smith ML : Structural Aspect of Ischemic Brain Damage. Acta Neuroch. (Supp). 36 : 126-132, 1986.
13. Kharasch N Thyagarajan BS : Structural Basis for Biological Activities of Dimethyl Sulfoxide. Ann. NY Acad. Sci. 411 : 391-402, 1983.
14. Kolp KH Jaenicke G Kramer M et al : Absorption and Distribution and Elimination of Labeled Dimethyl Sulfoxide in Man and Animals. Ann. NY. Acad. Sci. 141 : 85, 1967.
15. Meurer P Moskowitz MA Levine L Melamed E : The Synthesis of Prostaglandins by Bovine Cerebral Microvessels. Prostagl. Med. 4 : 153-161, 1980.
16. McCord JM : Oxygen Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. N. Eng. J. Med. 312 (3) : 159-163, 1985.
17. McGraw CP : Treatment of Cerebral Infarction with Dimethyl Sulfoxide in the Mongolian Gerbil. Ann. NY Acad. Sci 411 : 278-283, 1983.
18. Pace DG Kovacs JL Klevans LR : Dimethyl Sulfoxide Inhibits Ann. NY. Acad. Sci, 411 : 352-355. 1983.
19. Parker NB Bergen BM Curtis WE et al : Hydrogen Peroxidase Cause Dimethylthiourea Consumption while Hydroxyl Radical Causes Dimethyl Sulfoxide Consumption in Vitro. J. Free Radical Biol. Med. 1 : 415-419, 1985.
20. Rosenblum W : Dimethyl Sulfoxide Effects on Platelet Aggregation and Vascular Reactivity in Pial Microcirculation. Ann NY Acad Sci. 411 : 110-118, 1983.