

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI SEREBRAL ARTERİYEL VAZOSPAZMA KARŞI DEFERROXAMINE'İN ETKİSİ

Mustafa AKGÜN, H. Murat GÖKSEL, Orhan SOLAK, Zehra AKGÜN

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD, Sivas

ÖZET

Deneysel subaraknoid kanamadan (SAK) sonra ilk saatlerden itibaren günler hatta haftalar süren bir yaygın serebral arteriyel vazospazm (VS) görülmektedir. Bu arteriyel vazospazm bazı karmaşık fizyopatolojik mekanizmalar sonucu meydana gelmekte ve serebral dokuda iskemi meydana getirmektedir. Serebral dokunun iskemiye uğraması bir çok biyokimyasal reaksiyonun olaya katılması ile olmaktadır. Bu biyokimyasal reaksiyonlar arasında serbest oksijen radikallerinin tetiklenmesiyle olan membran lipid peroksidasyonu (LP) özel bir yere sahiptir. Serbest radikallerin oluşumunda ve LP reaksiyonlarının başlamasında ve sürdürülmesinde demir iyonları en önemli katalizördür. Bir demir bağlayıcı ajan olan deferroxamine (DF) serbest radikal oluşmasını önlemekle kalmayıp ayrıca kendisi bir serbest radikal tutucu kimyasal ajandır. Hücreler içine girebilmesi ve kan-beyin bariyerini sorunsuz geçebilmesi açısından önemli bir terapötik değeri olabilecek bir ilaçtır. Bu çalışmada tavşanlarda SAK'dan sonra VS üzerindeki DF etkisi araştırıldı. Serebral arteriyel VS'in derecesini saptamak amacıyla vertebrobasiler anjiyografi yapıldı. Çalışmada SAK'dan sonra serebral arteriyel VS'in DF tedavisi ile çözülebileceğini gösterdik.

Anahtar Sözcükler: Subaraknoid Kanama, Vazospazm, Deferroxamine

THE EFFECTS OF DEFERROXAMINE ON THE CEREBRAL ARTERIAL VASOSPASM IN SUBARACHNOID HEMORRHAGE

Diffuse cerebral arterial vasospasm occur early, following experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). During this prolonged period of vasospasm, some concomitant physiopathologic mechanisms cause ischemia of the cerebral tissue. Cerebral ischemia is the result of different biochemical reactions. Between these reactions, membrane lipid peroxidation and the free oxygen radicals, which are the trigger factor of this type of tissue injury, have a unique place. Free iron ions are the most important catalysors of free oxygen radical production and ; therefore the activation of lipid peroxidation. An iron chelator agent, Deferroxamine prevents the free oxygen radical production; and also scavenges the free oxygen radicals. This drug can cross the blood-brain barrier and access into the cells easily. Therefore the therapeutic potential of deferroxamine (DF) may increase in the future. In this study, the effects of DF on cerebral vasospasm following SAH in rabbits are investigated. Vertebro-basilar angiography was performed for the measurement of cerebral vasospasm. At the end of the study, we showed that, the cerebral vasospasm resolved significantly with DF treatment.

Key Words: Subarachnoid Hemorrhage, Vasospasm, Deferroxamine

GİRİŞ

Subaraknoid Kanamanın (SAK) ilk gününde vazospazm (VS) nadiren karşılaşılr, sıklıkla kanamanın 1. haftasından itibaren 3. haftaya kadar sürmekte ve hastaların %60 'da anjiyografik olarak gösterilebilmektedir (1).

Kan komponentleri olan eritrosit ürünleri, hemoglobün, demir içerikleri, plateletler ve fibrin yıkım ürünlerinin VS yapıcı etkileri olduğu savunulmaktadır. Ayrıca ksantokromik BOS'nın da VS yapıcı etkisi olduğu deneysel çalışmalarla bildirilmiştir (2-11). Yine benzer şekilde kanda varlığı bilinen çeşitli kimyasal ajanların düz kas kontraksiyonu yapıcı etkileri olduğu bildirilmektedir (1, 12).

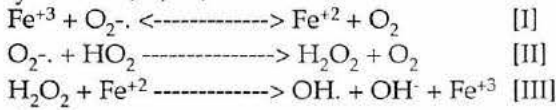
Serebral arteriyel VS'in kesin etiyolojisi ve patofizyolojisi ekseriyetle iyi bilinmemektedir. Diğer taraftan VS'i önleyici tedaviye başlanması son 20 yıl içinde olmuştur ve belirgin bir başarı hala elde edilememiştir. Klinikte değişik tedavi şekilleri uygulanmaktadır (13).

Memeli hücrelerinde normal hücre biyokimyasını yürüten reaksiyonlar oksijene şiddetle bağımlıdır ve hafif alkali ortamda ATP'nin

SAK	: Subaraknoid Kanama
VS	: Vazospazm
LP	: Lipid Peroksidasyonu
DF	: Deferroxamine
SOD	: Superoksid Dismutaz

de varlığında bu reaksiyonlar devam etmektedir. İskemi sırasında hücrelerdeki kimyasal reaksiyonlar sona ermez, aksine mevcut enzimlerle yürütülmeyen; kontrol altında tutulamayan oksijenin ve yeterli miktarda ATP'nin bulunmadığı ortamda indüklenen ve asidik bir ortamda oluşan reaksiyonlara doğru kayar (14). Bu reaksiyonlarda Fe⁺² başlıca katalizör (Fenton tipi ve Haber-Weiss) görevi görerek bir dizi zincirleme reaksiyonu da beraberinde getirir ve hücre ölümlerine neden olur (15, 16). Ortamda demir şelatlarının bulunması ADP ile birlikte Haber-Weiss reaksiyonlarını hızlandırarak moleküler oksijenden O₂⁻ radikallerinin [I], H₂O₂ ile Fe⁺² 'nin bir arada bulunması da Fenton tip reaksiyonla OH⁻ radikallerinin [III] oluşmasını ve LP reaksiyonlarının gelişmesine neden olur (16, 17). LP'unun en önemli fizyolojik katalizörü demir

iyonudur (15, 16).



Demir Bağlayıcı Ajan Deferroxamine: Streptomyces pilosus bakterilerinden elde edilen, düşük molekül ağırlıklı, kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen, hatta hücre zarını da sorunsuz geçebilen bir bileşiktir (18, 19, 20, 21, 22, 23).

DF membranlarda lipid peroksidasyonun başlangıcını ve güçlenmesini hidroksil radikallerinin oluşumunu demir iyonlarını bağlayarak engeller (24). Ayrıca Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonlarını katalizleyen demir iyonlarını ortamdaki uzaklaştırarak LP'nun ilerlemesini durdurur (18).

DF serbest demir iyonlarını bağlayarak LP'nu engellediği gibi Na-K ATP'az enziminin aktivitesi üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (22).

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Protokolü: Bu çalışmada her iki cinsten, ağırlıkları 1750-2500 gram (ortalama 2108 gr) arasında değişen 9 adet albino tavşan kullanıldı. Deney süresince hayvanlar C.Ü.T.F. Deney Hayvanları Merkezinde tutuldu. Tüm denekler için çevre ısı ve nemi aynı idi ve deney süresince serbest beslenme rejimi uygulandı. Denekler 3 adetlik 3 gruba ayrıldı. 1. Grup: Sham operasyonu grubu, 2. Grup: SAK grubu, 3. Grup: SAK sonrası DF ile tedavi edilen grup.

Tüm deneklere Ketamin Hidroklorür 25 mg/kg/ ve Xylazine 5 mg/kg dozunda intramusküler (i.m.) yolla verilerek uygun anestezi sağlandı. Tüm deneklerin oksipital bölgeleri traş edildi ve perkutan yolla 23 G intraket ile sisterna magna ponksiyonu yapıldı. BOS geldiği görüldü ve yaklaşık 0.5-1 ml BOS drene edildi. Bu şekilde gerçekleştirilen sisterna magna ponksiyonu sonrası 1. grupta 1 ml/kg %0.9'luk serum fizyolojik 2. ve 3. grupta 1 ml/kg otolog heparinsiz arteriyel kan verildi. Tüm gruplarda denekler sisternal injeksiyon sonrası 15 dk. süreyle 45° başaşağı pozisyonda tutuldu. 3. grupta SAK oluşturulduktan sonra 8 saat sonra ilk doz uygulanmak üzere ve günlük total doz ikiye bölünerek 12 saate bir, 7 gün süreyle, 50 mg/kg/gün/i.m. dozunda Deferroxamine (Desferal-Ciba) verildi. Her üç gruptaki denekler 7 gün süreyle normal şartlarda beslendi ve bakımları yapıldı. SAK sonrası 7. günde vertebobaziler anjiyografi yapıldı.

Ketamin Hidroklorür ve Xylazine anestezisi altında tek taraf aksillada alan temizliğinden sonra yapılan insizyonla aksiller arter ortaya kondu ve

distalden bağlandı. 23 G intraket ile arter kateterize edildi.

Kateter heparinle yıkandıktan sonra 3 yollu musluk takıldı ve kateter yerine tespit edildi, cilt primer suture edildi. Daha sonra denek grafi çekilmek üzere masaya alındı. Kontrast madde Iopamidol (Iopamiro-Syntex) 300 mg/ml'den 3.5 ml/kg dozunda intrarteriyel enjekte edildi ve prone pozisyonda grafi çekildi, çekilen grafilerde vertebral arter ve baziller arter görüldükten sonra işleme son verildi.

Baziler arter çapları İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi ile değerlendirildi., P<0.05 sonucu istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

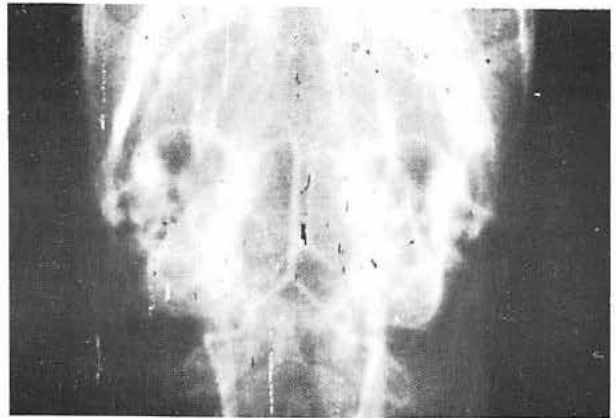
BULGULAR

Anjiyografide milimetrik büyüteç ile ölçülen baziler arterlerin çaplarının ortalamaları Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I. Sham, SAK ve DF ile tedavi edilen SAK gruplarında baziler arter çapları görülmektedir.

Denek No	SHAM (mm)	SAK (mm)	SAK+DF (mm)
1.	1.3	0.8	1
2.	1.2	0.8	1.2
3.	1.2	0.5	1.3
Ortalama	1.2333±0.0577	0.7±0.1732	1.1667±0.1528

Sham grubunda 3 deneye yapılan anjiyografilerde VS görülmedi (Resim 1). SAK grubunda 3 deneye anjiyografi yapıldığında her 3 denekte de şiddetli VS geliştiği saptandı (Resim 2). DF ile tedavi edilen SAK grubunda ise VS'nin belirgin olmadığı görüldü (Resim 3). Baziler arterlerin çapları bakımından, istatistiksel olarak (Tablo II) Sham ve SAK grupları arasında, SAK ve SAK+DF grupları arasında anlamlı bulunurken, Sham ve SAK+DF grupları arasında ise anlamlı bulunmadı.



Resim 1: Sham grubundaki baziler arterin normal kalibrasyonu görülmektedir.



Resim II: SAK grubundaki baziller arterde şiddetli vazospazm görülmektedir.



Resim 3. DF ile tedavi edilen SAK'lı deneklerde vazospazm olmadığı görülmektedir.

Tablo II: Her Üç Grubun İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

SHAM ve SAK Grubunun Karşılaştırılması	P<0.025
SAK ve DF Grubunun Karşılaştırılması	P<0.05
SHAM ve DF Grubunun Karşılaştırılması	P>0.05

TARTIŞMA

Bu çalışmada tavşanlarda sisterna magna içine otolog arteriyel kan enjeksiyonu ile SAK oluşturuldu. SAK sonrası serebral arteriyel VS geliştiği anjiyografik çalışma ile gösterildi.

Deney hayvanlarında sisterna magna içine otolog arteriyel kan enjeksiyonu ile insanlardakine benzer şekilde bifazik serebral arteriyel VS geliştiği saptanmıştır (1, 25, 26). Biz çalışmamızda tek sisternal ponksiyon uygulayarak SAK oluşturduk. Deneklerde uyguladığımız SAK'dan sonra serebral arteriyel VS'in geç komponentinin geliştiğini SAK grubunda vertebrobaziler anjiyografi yaparak gösterdik. VS derecesini saptamak amacıyla baziler arter çaplarını ölçtük (Tablo I).

Her üç grupta elde ettiğimiz anjiyografik bulguları gözden geçirdiğimizde Sham operasyonu uygulanan grupta baziler arter çapları ortalaması 1.2333 ± 0.0577 mm olarak bulundu. SAK grubunda ise basiler arter çapları ortalaması 0.7 ± 0.1732 mm olarak bulundu. Sham grubu ile karşılaştırıldığında gerçekten göze çarpan bir farklılık oluşturuyordu. Sham grubu ile SAK grubundaki baziler arter çapları arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, fark $P < 0.025$ düzeyinde anlamlı bulundu (Tablo II). SAK grubunda elde ettiğimiz belirgin VS Resim 2'de görülmektedir. DF tedavisi uyguladığımız grupta ise baziler arter çapları ortalaması 1.1667 ± 0.1528 mm olarak bulundu. Resim 3'de normal kalibrasyonda baziler arter görülmektedir. Bu ölçümler Sham grubunda ölçülen baziler arter çaplarının ortalamasına yakındı (Tablo I). Sham grubu ile DF tedavisi altındaki 3. grup deneklerin baziler arter çapları karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak da anlamlı fark olmadığı saptandı ($P > 0.05$) (Tablo II). SAK ve SAK+DF gruplarında $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo II).

Volmer ve ark., tavşan SAK modellerinde yapılan DF tedavisinin SAK'nın 3. gününde baziler arter çapları üzerinde damar daralmasını azaltıcı yönde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile DF'nin VS üzerinde tedavi edici potansiyeli olduğunu ileri sürmüşlerdir (27).

Harada ve ark. yaptıkları bir çalışmada gecikmiş (7. günde) arteriyel daralma üzerinde DF'nin önemli derecede inhibisyon yaptığını bildirmişlerdir. İlave olarak inkube edilmiş kandan in vitro ortamda ortama salınan demir iyonlarını bağladığını; in vivo ortamda da doza bağlı olarak damar daralmasına karşı protektif etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (28).

Comair ve ark. düz kas hücre kültürlerinde oksihemoglobinin yaptığı oksidant hasarın DF ile önlenebildiğini ileri sürmüşlerdir (3).

Cerchiari ve ark. 1987'de yaptıkları çalışmalarında köpeklerde kardiovasküler arrest sonrası DF ve Superoksid Dismutaz'ın (SOD) protektif etkisini araştırmışlar; bu çalışmalarında DF'nin beyin hücreleri içine girişinin kolaylığı nedeniyle SOD'a göre LP düzeyleri üzerinde daha etkili olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmacılar ayrıca uyguladıkları tedavinin kardiopulmoner resusitasyondan sonraki serebral kan akımı üzerine etkisini araştırmışlar. DF ve SOD tedavisinden sonra deneklerde serebral kan akımı ölçümlerinde önemli derecede normalizasyon saptamışlardır (24).

Biz bu çalışmamızda SAK'nın daha geç döneminde klinik sorunlara yol açan VS'nin 7. gününde DF'nin etkilerini araştırmayı amaçlamıştık. Bununla birlikte SAK'dan sonra 7 gün boyunca uyguladığımız 50 mg/kg/gün (12 saatte bir) DF tedavisi ile anjiyografik VS'nin çözüldüğünü saptadık. VS etiyolojisinde rol oynayan serbest radikallerin oluşması DF tarafından engellenmektedir. Bizim elde ettiğimiz bu bulgular DF ile VS'nin tedavi edilebileceğini düşündürmektedir.

SAK'dan sonra gelişen VS'a sekonder olarak beyin hücrelerinde ve damar duvarlarında iskemik hasara neden olan ve iskemik olayların şiddetini arttıran birçok biyokimyasal reaksiyon olmaktadır. Bu biyokimyasal reaksiyonlar serbest radikallerin devreye girmesi ile hızlanmakta ve hücre ölümüne kadar gitmektedir. Hücre ölümüne neden olan bu biyokimyasal reaksiyonlar LP'nun sonucudur (29-32). Bizim elde ettiğimiz bulgulara göre DF anjiyografik vazospazmı düzeltmektedir ve bu etkisini muhtemelen damar duvarındaki lipid peroksidasyonunu engelleyerek göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Wilkins R.H.: Cerebral vasospasm; Wilkins RH; "Neurosurgery Update II"; Chp: 63, p:78-94, USA, 1991.
- 2- Willmore L.J., Rubin J.J.: Effects of antiperoxidants on FeCl₂ induced lipid peroxidation and focal edema in rat brain; *Experimental Neurology* 83:62-70, 1984.
- 3- Camair Y.G., Schipper H.M. Brem S.: The prevention of oxyhemoglobin-induced endothelial and smooth muscle cytoskeletal injury by deferoxamine; *Neurosurgery* Vol 32, No 1: 58-65, 1993.
- 4- Ozaki N., Mullan S.: Possible role of the erythrocyte in causing prolonged cerebral vasospasm; *J Neurosurg* 51:773-778, 1970.
- 5- Fuji S., Fujitsu K.: Experimental vasospasm in cultured arterial smooth muscle cells; *J Neurosurg* 69:92-97, 1988.
- 6- Steele J.A., Stockbridge N., Maljkovic G., Weir b.: Effect of hemoglobin on isolated cerebrovascular smooth muscle cells; *The Canadian Journal of Neurological Sciences*; Vol 16, No 2, 278-279, 1989.
- 7- Takanashi Y., Weir B.K.A., Vollrath B., Kasuya H., Macdonald R.L., Cook D.D.: Time course of changes in concentration of smooth muscle cells exposed to oxy hemoglobin; *Neurosurgery* Vol 30, No 3, 346-350, 1992.
- 8- Foley P.L., Kassel F.N. Hudson S.B. Leek S.: Hemoglobin penetration in the wall of the rabbit basilar artery after

- subarachnoid hemorrhage and intracisternal hemoglobin injection; *Acta Neurochirurgica (Wien)* 123: 82-86, 1993.
- 9- Sayed M.H.S., Anderson D.K., Panter S.S., Hallaway P.E., Eaton J.W.: Hemoglobin potentiates central nervous system damage; *J Clin Invest*, Vol 79, pp: 662-664, 1987.
- 10- Knight J.A., Blaylock R.C., Searles D.A.: Lipid peroxidation in platelet concentrates: Effects of irradiation and metal chelators; *Annals of Clinical and Laboratory Science* Vol 23, No 5:333-339, 1993.
- 11- Thomas C.E., Morehouse L.A., Aust S.D.: Ferritin and superoxide dependent lipid peroxidation; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 260, No 6, pp:3275-3280, 1985.
- 12- Pickard J.D., Nelson R.J., Martin J.L.: Cerebral vasospasm: Crockard A., Hayward R., Hoff J.T.: "Neurosurgery the Scientific Basis of Clinical Practice"; Chpt: p:417-437, 1992.
- 13- Greenberg M.S.: SAH and aneurysms; *Handbook of Neurosurgery*; Chp: 47, p:711-752, USA, 1994.
- 14- White B.C., Krause G.S., Aust S.D., Eyster G.E.: Post ischemic tissue injury by iron-mediated free radical lipid peroxidation; *Annals of Emergency Medicine* 14:805-809, 1985.
- 15- Yavuz Ö.: Gerbillerde deneysel olarak oluşturulan iskemik reperfüzyon modelinde 2-kloroadenin beyin dokusu lipid peroksid düzeyi ve glutatyon peroksidaz aktivitesine etkisi; Gazi Üniversitesi Biyokimya A.B.D., Ankara-1994.
- 16- Yenikaya E.: Beyin tümörlü hastalarda serum ve doku lipid peroksidasyonu ile serum askorbik asit ve demir düzeylerinin incelenmesi, Uzmanlık Tezi; Gazi Üniversitesi Biyokimya A.B.D. Ankara-1990.
- 17- Braugher J.M., Duncan L.A., Chate R.L.: The involvement of iron in lipid peroxidation; importance of ferric to ferrous ratios in initiation; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 261, No 22, pp:10282-10289, 1986.
- 18- Minotti G., Aust S.D.: The role of iron in the initiation of lipid peroxidation; *Chemistry and Physics of Lipids*, 44:191-208, 1987.
- 19- Ikeda Y., Ikeda K., Long D.M.: Comparative study of different iron-chelating agents in cold induced brain edema; *Neurosurgery* Vol 24, No 6, p:820-824, 1989.
- 20- Fleisher J.E., Lanier W.L., Milde J.H., Michenfelder J.D.: Failure of deferoxamine, an iron chelator, to improve neurologic outcome following complete cerebral ischemia in Dogs; *Stroke* 18:124-127, 1987.
- 21- Halliwell B.: Use of deferoxamine as a 'probe' for iron dependent formation of hydroxyl radicals evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical; *Biochemical Pharmacology*, Vol 34, No 2, pp:229-233, 1985.
- 22- Bilgihan A., Türközkan N., Arıcıoğlu A., Aykol Ş., Çevik C., Göksel M.: The effect of deferoxamine on brain lipide peroxide levels and Na-K ATPase activity, following experimental subarachnoid hemorrhage; *Gen Pharmac* Vol 25, No 3, pp:495-497, 1994.
- 23- Hershko C., Weatherall D.J.: Iron-chelating therapy; *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, Vol 26, Issue 4, 303-345, 1988.
- 24- Cerchiari E.L., Hoel T.M., Safar P., Scabassi R.J.: Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs; *Stroke* 18:869-878, 1987.
- 25- Delgado J.T., Brismar J., Svendgaard N.A.: Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries; *Stroke* Vol 16, No 4, pp:595-602, 1985.
- 26- Endo S., Branson P.J., Alksne J.F.: Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits; *Stroke* Vol 19, No 11, pp:1420-1425, 1988.
- 27- Vollmer D.G., Hongo K., Ogawa H., Tsukahara T., Kassel N.: A study of the effectiveness of the iron-chelating agent deferoxamine as vasospasm prophylaxis in a rabbit model of subarachnoid hemorrhage; *Neurosurgery* Vol 28, No 1, p:27-32, 1991.
- 28- Harada T., Mayberg M.R.: Inhibition of delayed arterial narrowing by the iron-chelating agent deferoxamine; *J Neurosurg* 77:763-767, 1992.

29- Göksel H.M.: Deneysel subaraknoid kanama sonrası doku lipid peroxidasyona demir bağlayıcı ajan ve kalsiyum kanal blokörlerinin etkileri; Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı. Ankara, 1992.
30- Braughler J.M., Chase R.L., Progenzer J.F.: Stimulation and inhibition of iron-dependent lipid peroxidation by deferroxamine; *Biochemical and Biophysical Research*

Communications Vol 153, No 3, pp:933-938, 1988.
31- Mc Call J.M., Braughler J.M., Hall E.D.: Lipid peroxidation and role of oxygen radicals in CNS injury; *Acta Anesthesiologica Belgica*, 38:373-379, 1987.
32- Arıcıoğlu A.: Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı; *Doktor Genel Tıp Derleme Dergisi* 2/3, s:239-242, Ankara-1994.