

Tirofiban'ın Geçici Beyin İskemisi Yapılmış Ratlardaki Nöroprotektif Etkisinin İncelenmesi: Ön Çalışma Sonuçları

Neuroprotective Effect of Tirofiban on Temporary Brain Ischemia in Rats: A Preliminary Report

ALPER KARAOĞLAN, MURAT H. UÇANKALE, ŞEREF BARUT,
HAFİZE UZUN, AHMET BELCE, AHMET ÇOLAK

Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniği (AK, MHU, ŞB, AÇ) ve
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya ABD (HU, AB), İstanbul

Geliş Tarihi: 27.11.2001 ⇔ Kabul Tarihi: 5.12.2001

Özet: Amaç: Bu deneysel çalışmada bir antiplatelet ajan olup Platelet Glikoprotein (GP) IIb/IIIa reseptör antagonisti olarak etki eden tirofibanın ratlarda oluşturulan geçici serebral iskemi modelindeki nöroprotektif etkinliği incelenmiştir.

Yöntemler: Deneyler, sham-operated kontrol, iskemi ve tedavi grubu olmak üzere 3 gruba ayrılan 24 adet wistar albino ratta yapılmıştır. Geçici serebral iskemi, bilateral carotis communis arterlerin 10 dakika süreyle oklüzyonu ile oluşturulmuştur. Tedavi grubundaki deneklere iskemi sonrasında İV 0,4 µgr/kg/dakika dozunda 30 dakika süreyle infüzyon şeklinde tirofiban verilmiştir. Denekler iskemiden 3 saat sonra sakrifiye edilerek beyin dokuları çıkarılmıştır. İskeminin etkileri ve tirofiban tedavisinin etkinliği biyokimyasal parametrelerle (doku lipid peroksidasyonu-malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), superoksit dismutaz (SOD) ve ATP düzeyleri ile) incelenmiştir.

Bulgular: Ortalama doku lipid peroksidasyon düzeyleri, 1. grupta $129,12 \pm 2,69$, iskemi grubunda $233,00 \pm 3,25$ ve tirofiban tedavi grubunda ise $163,62 \pm 3,96$ nmol/gr yağ doku idi. Ortalama doku NO düzeyleri ise 1. grupta $0,51 \pm 0,02$, iskemi grubunda $0,73 \pm 0,02$ ve tedavi grubunda $0,58 \pm 0,02$ µmol/mg olarak ölçüldü. Bir başka değişle doku lipid peroksidasyon ve NO düzeyleri tirofiban tedavisi ile istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir şekilde düşmüştür ($p < 0,001$). Doku SOD düzeyleri ise kontrol grubunda ortalama $11,20 \pm 0,25$ U/mgr protein iken, tedavi grubunda $12,57 \pm 0,19$ U/mgr protein idi. Doku

Abstract: Objective: In this experimental study, the neuroprotective effect of tirofiban on temporary brain ischemia was investigated in a rat model. Tirofiban is an antiplatelet drug which acts as the antagonist of GP IIb/IIIa.

Methods: The experiments were performed 24 Wistar albino rats divided into three groups: sham-operated control, ischemia-created control and tirofiban-treatment groups. Temporary cerebral ischemia was created by the occlusion of bilateral carotid communis arteries for 10 minutes. In the treatment group, a tirofiban infusion (I.V. 0.4 µg /kg /minute) for 30 minutes was given by the femoral vein. The rats were sacrificed at the 3rd hour after ischemia and their brains were removed. The effects of ischemia and the efficacy of tirofiban were investigated by the assessment of the tissue lipid peroxidation, nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and ATP levels.

Results: The average lipid peroxidation levels were $129,12 \pm 2,69$ in group I, $233 \pm 3,25$ in group II, and $163,62 \pm 3,96$ nmol/g wet tissue in group III. The mean tissue NO levels were $0,51 \pm 0,02$ in the first group, $0,73 \pm 0,02$ in the ischemic group, and it was $0,58 \pm 0,02$ µmol/mg in the treatment group. In other words, the levels of lipid peroxidation and NO statistically decreased after the tirofiban treatment ($p < 0,001$). The average tissue SOD level in the control group was $11,20 \pm 0,25$ U/mg protein whereas it was $12,57 \pm 0,19$ U/mg protein in the treatment group. The mean level of tissue ATP in ischemia group was $65,97 \pm 12,25$ nmol/g wet tissue while it was $125,83 \pm 16,46$ nmol/g wet tissue in treatment group.

ATP ortalama düzeyleri iskemi grubunda $65,97 \pm 12,25$ nmol/gr yaş doku, tedavi grubunda ise $125,83 \pm 16,40$ nmol/gr yaş doku idi.

Sonuç: İskemi ile düşmüş olan doku SOD ve ATP düzeyleri tirofiban tedavisi ile anlamlı bir şekilde yükselmişti ($p<0,001$). Tüm bu bulgular, iskemi sonrası hemen başlanan tirofibanın akut serebral iskemi tedavisinde potansiyel rolü olabileceğini ve alternatif tedavi yaklaşımı oluşturabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin iskemisi, nöroprotektif ajanlar, rat, trombosit agregasyon inhibitörleri, trombosit glikoprotein GP IIb/IIIa kompleks.

Conclusion: In the ischemia group, a significant decrease in SOD and ATP levels was seen. After the tirofiban treatment, the decreased SOD and ATP tissue levels increased ($p<0,001$). All these findings have revealed that tirofiban used immediately after ischemia may have a potential role in the treatment of acute cerebral ischemia and that it may be an alternative agent in these cases.

Key Words: Brain ischemia, neuroprotective agents, rat, thrombocyte aggregation inhibitors, thrombocyte glycoprotein GP IIb/IIIa complex.

GİRİŞ

Serebral iskemi pratikte en sık karşılaşılan nörolojik ve nöroşirürjikal problemlerden biridir. Serebral iskeminin fizyopatolojisinde bir çok faktörlerle birlikte trombosit aktivasyonu ve agregasyonu sonucu mikrovasküler embolilerin rol oynadığı bilinmektedir (3). İskemik bölgenin kılcaldamarları içinde granüle trombosit ve fibrinin birlikte toplandığı elektron-mikroskopisi çalışması ile de gösterilmiştir (14). Dokulardaki postkapiller venüller içinde polimorfonükleer lökosit-fibrin-trombosit agregatlarının bulunmasıyla yeniden akımın olmadığı gözlenmiş, mikrovasküler oklüzyon oluşumunda trombosit ve polimorfonükleer lökositlerin aktif katılımı olduğu ileri sürülmüştür (14). Bu gözlemler serebral vasküler oklüzyon sonrası mikro damarlardaki trombosit akümüasyonu genel hipotezinin lokal iskemide ve nöron hasarında katkısı olduğunu desteklemektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarla aspirin, ticlopidin, dipiridamol gibi antiplatelet ajanların da serebral iskemideki nöroprotektif etkileri ortaya konmuştur (2,5,16,18,25). Ayrıca hayvan modellerinde integrin, disintegrin, triflavin gibi GP IIb/IIIa reseptör antagonistleriyle başarılı sonuçlar alınmıştır (1,30).

Tirofiban GP IIb/IIIa reseptörünü reversibl olarak antagonize eden bir antiplatelet ajandır (44). Bu özelliği ile tirofiban platelet agregasyonunun en temel aşaması olan fibrinojen ağının oluşmasını bloke eder (44). Tirofiban'ın platelet agregasyonunu yüksek oranda inhibe ettiği ve arteryel tromboz oluşumunu önlediği deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir (24). Tirofiban miyokardiyal iskemide, unstabl angina pectorisde, koroner anjioplasti sonrasında ve akut koroner sendromlarda tek başına veya heparinle kombine edilerek başarıyla kullanılmaktadır (11,17,33,42,44,45).

Bu çalışmada benzer fizyopatolojiye sahip olan serebral iskemide tirofibanın nöroprotektif etkileri deneysel geçici ön beyin iskemisi oluşturulmuş ratlarda incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 250-300 gr. ağırlığında 24 adet erişkin erkek Wistar albino rat kullanıldı. Hayvanlar bir gün önceden aç bırakılarak İ.M. 60 mg. / kg. ketamine (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul) ve İ.M. 9 mg./kg. Xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul) ile anesteziyi sağlandı. Operasyon sırasında gerektiğinde ek dozlar yapıldı. % 0,9 Na Cl solüsyonu ve ilaç infüzyonu için femoral ven kateterizasyonu, PaO₂, pH, PaCO₂, nabız ve arteryel kan basıncı monitörizasyonu için femoral arter kateterizasyonu yapıldı. Vücut sıcaklığı rektal termometre ile monitörize edilerek, ısıtıcı lamba ile 37°C de tutuldu.

Ratlar supine pozisyonda sabitlendi. Servikal orta hattan basit bir insizyonla bilateral karotis kommunis arterler ortaya kondu ve her iki karotis kommunis, Yaşargil anevrizma klip'leri ile 10 dk. süre ile kliplendikten sonra klipler açılarak reperfüzyon sağlandı. İskemiden 3 saat sonra hayvanlar intraperitoneal yüksek doz pentotal sodyum verilerek sakrifiye edildi. Geniş kraniektomi yapılarak beyinleri biyokimyasal tetkik amacıyla çıkarılıp sıvı nitrojen içine konuldu (29).

DENEY PROTOKOLÜ

Hayvanlar her biri 8 rattan oluşan 3 gruba ayrıldı.

Grup I (Sham operated kontrol grubu): Bu gruptaki hayvanlar servikal orta hatta bir insizyonla bilateral karotis kommunis arterler ortaya

çıkarıldıktan daha sonra ciltleri 3-0 ipek ile kapatıldı. 3 saat sonra hayvanların beyinleri daha önce tarif edildiği üzere çıkarılarak biyokimyasal tetkik için sıvı azot içine konuldu.

Grup II (Kontrol grubu) : Bu gruptaki hayvanlar 1. grupta olduğu gibi bilateral karotis kommunis arterler 10 dakika boyunca anevrizma klipleri kullanılarak kliplendi ve 10 dakika sonra klipler açılarak reperfüzyon sağlandı. Klipler açıldıktan hemen sonra 30 dakika boyunca İ.V. 12 ml./kg. % 0.9'luk NaCl solüsyonu infüzyonu yapıldı. İskemiden 3 saat sonra hayvanlar sakrifiye edildi ve beyinleri çıkarılarak biyokimyasal tetkik için sıvı azot içine konuldu.

Grup III (Tedavi Grubu) : Bu gruptaki hayvanlarda 2. grupta olduğu gibi bilateral karotis kommunis arterler ortaya konuldu ve 10 dakika süre ile anevrizma klipleri ile kliplendikten sonra klipler açılarak reperfüzyon sağlandı. Daha sonra 30 dakika süreyle İ.V. 0,4 µg/kg/dk dozunda tirofiban hydrochloride infüzyonu yapıldı. İskemiden 3 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek beyinleri 1. ve 2. grupta olduğu gibi çıkarıldı ve biyokimyasal tetkik için sıvı azot içine gömüldü.

Tirofiban (Aggrastate) Merck Sharpe and Dohme firmasından satın alındı. 1µg/1 ml. % 0.9 NaCl olacak şekilde hazırlandı.

BİOKİMYASAL İNCELEME

Yaş ağırlıkları 25-50 gr arasında değişen doku örnekleri, % 0,9'luk NaCl içerisinde, Potter tipi cam homojenizatör (Hiedolph-RZR 2021-Germany) kullanılarak homojenize edildi ve % 20'lik (%20 gr/ml) homojenatlar hazırlandı. Elde edilen doku homojenatları orta şiddette ve 30 saniye süre ile 2 kez sonike edildi (MSE, Kod:11-73, Seri: PG597). Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri +4°C'lik ortamda yapıldı. Homojenatlar daha sonra, 1500 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlarda MDA, NO, SOD ve ATP düzeyleri ölçüldü. Bütün analizler aynı gün ve aynı koşullarda yapıldı.

MDA ile Lipit Peroksidasyonunun Ölçümü:

Lipit peroksidasyonunun tayini için, lipit hidroperoksidlerden türeyen çeşitli aldehitlerin kantitatif ölçümüne dayanan ve Tiobarbutirik Asit Reaktif Substrat (TBARŞ) olarak da bilinen Beuge ve Aust'un (6) tanımladığı yöntemin modifiye şekli kullanıldı. Birimler nmol/gram yaş doku olarak hesaplandı.

NO'in Ölçümü:

Bu çalışmada NO ölçümü, stabil metabolitleri olan nitrit ve nitrat iyonlarının konsantrasyonlarının saptanmasına dayanan, Grishom ve ark. (23) tarafından önerilen yöntemle, Nitrat/Nitrit kolorimetrik metod kiti (Boehringer Mannheim, 1746081) kullanıldı. Birimler µmol/mgr. protein olarak hesaplandı.

SOD Ölçümü:

SOD aktivitesinin tayini için ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan superoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanan bir yöntem kullanıldı (52). Birimler U/mg protein olarak hesaplandı.

ATP Ölçümü:

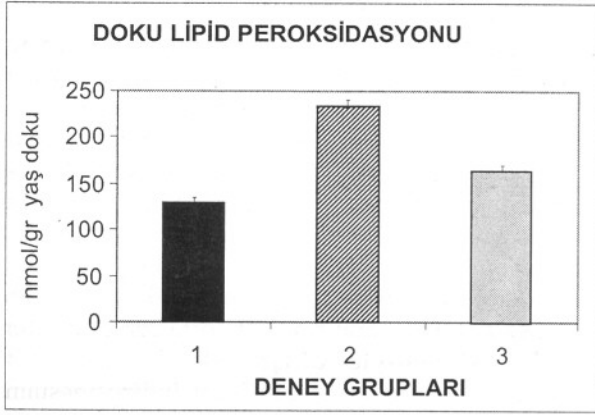
0,5 ml homojenat alındı, üzerine 0,5 ml % 12 lik Triklorasetikasid eklendi, karıştırılıp 5 dakika buz banyosunda bekletildi. 3000 rpm de 10 dakika santrifüj sonrası supernatan alındı. 0,3 mgr NADH içeren şişeye 1 ml PGA tamponlu çözelti 0,5 ml distile su eklenip karıştırıldı. Bu karışımdan 0,75 ml supernatan konuldu. Küvete aktarılıp suya karşı 340 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Küvet içine 0,02 ml GADP/PGK enzim karışımı (Sigma Diagnostic-adenosine-5'-triphosphate (ATP), Procedure no.366-UV, Catalog no.340-13) konuldu, karıştırılarak suya karşı 340 nm de absorbans okundu. Birimler nmol/gram yaş doku olarak hesaplandı.

İSTATİKSEL DEĞERLENDİRMELER:

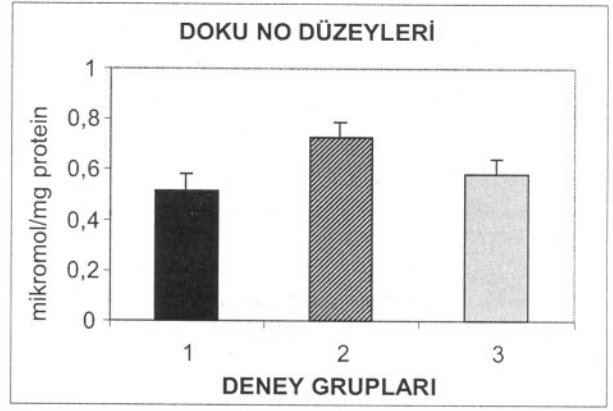
İstatiksel değerlendirmeler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyoistatistik A.B.D.'nda yapıldı. MDA, NO, SOD ve ATP değerleri için, varyans çözümlemesi ile gruba göre anlamlı fark olup olmadığı belirlendi. Gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. İkili karşılaştırmalar Tukey HSD testi ile yapıldı. Sonuçlar p<0,001'e göre anlamlı olarak değerlendirildi.

SONUÇLAR

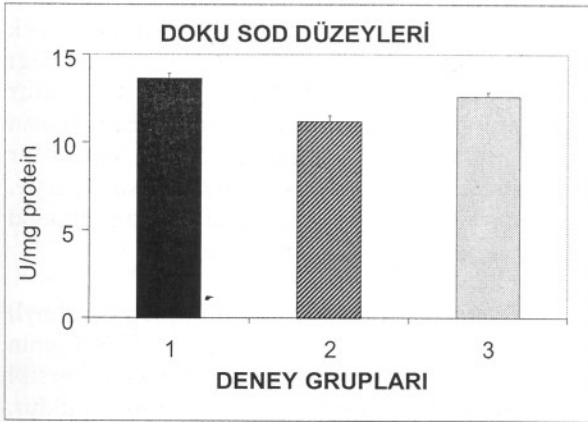
Birinci grupta doku MDA değerleri (lipit peroksidasyon düzeyleri) 133 ve 125 arasında değişiyordu ve ortalaması 129,12 ± 2,69 nmol/gr yaş doku idi (Şekil 1). Doku NO düzeyleri ortalaması ise 0,51 ± 0,02 µmol/mgr idi (Şekil 2). Doku SOD düzeyleri ortalama 13,62 ± 0,28 U/mgr proteindi (Şekil 3). 219,91 ve 190,59 arasında değişen doku ATP düzeyleri ise ortalama 205,25 ± 9,77 nmol/gr yaş



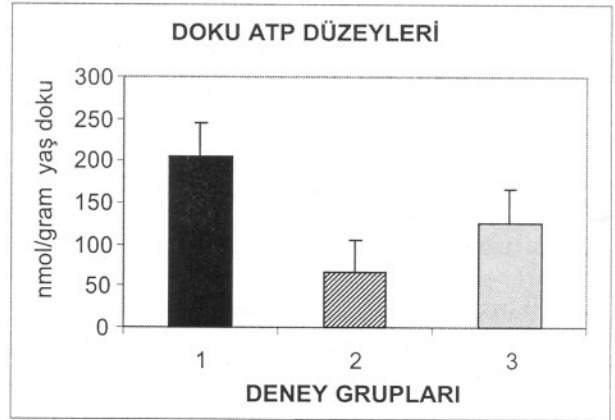
Şekil 1: Doku lipit peroksidasyonu değerlerinin dağılımı



Şekil 2: Doku NO düzeylerinin gruplara göre dağılımı



Şekil 3: Doku SOD düzeylerinin deney gruplarına göre dağılımı



Şekil 4: Doku ATP düzeylerinin gruplara göre dağılımı

doku olarak ölçüldü (Şekil 4).

İkinci grupta lipit peroksidasyon düzeyleri 238 ve 229 nmol/gr yaş doku arasında değişiyordu ve ortalaması $233 \pm 3,25$ nmol/gr yaş doku bulundu (Şekil 1). I. ve II. gruptaki lipit peroksidasyon düzeyleri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel yönden anlamlıydı ($p < 0,001$). Bir başka deyişle, 10 dakikalık bilateral carotis communis arterlerin ligasyonu ve reperfüzyondan 3 saat sonra doku lipit peroksidasyon seviyesinde % 80 oranında artış gözlemlendi. Doku NO düzeyleri ortalama $0,73 \pm 0,02$ μ mol/mgr olarak ölçüldü (Şekil 2). I. grup ile II. grup arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Yani 10 dakikalık iskemi NO düzeyinde % 21'lik bir artış oluşturdu. Doku SOD düzeyleri ortalama $11,2 \pm 0,25$ U/mgr protein olarak bulundu (Şekil 3). İlk grupla arasındaki fark istatistiksel

yönden anlamlı idi ($p < 0,001$). SOD düzeylerinde % 17,8 oranında düşüş saptandı. Doku ATP düzeyleri 78,19 ve 43,98 nmol/gr yaş doku arasında değişmekle birlikte ortalama $65,97 \pm 12,25$ nmol/gr yaş doku ölçüldü (Şekil 4). I. ve II. grup karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel yönden anlamlıydı ($p < 0,001$). Bir başka deyişle oluşturulan bilateral iskemi doku ATP seviyesinde % 67,8 oranında düşüşe neden oldu.

Üçüncü grupta lipit peroksidasyon düzeyleri 169 ile 158 arasında değişmekle birlikte ortalama $163,62 \pm 3,96$ nmol/gr yaş doku olarak ölçüldü (Şekil 1). II. grup ve tirofiban ile tedavi edilmiş III. grup arasında $69,375$ nmol/gr yaş doku farklılık vardı. Yani tedavi ile lipit peroksidasyon seviyelerinde % 42,3'lük bir nöroprotektif etkinlik elde edilmiştir. Doku NO düzeyleri ortalama $0,58 \pm 0,02$ μ mol/mgr

olarak ölçüldü (Şekil 2). II. grup ile III. grup arasındaki fark ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Tirofiban tedavisi ile doku NO düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü saptandı. Doku SOD düzeyleri ortalama $12,57 \pm 0,19$ U/mgr protein bulundu (Şekil 3). II. ve III. gruplar karşılaştırıldığında SOD düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde tekrar yükseldi ($p < 0,001$). Bir başka değişle tirofiban tedavisi ile iyileşme sağlandığı saptandı. Doku ATP düzeyleri ortalama $125,83 \pm 16,46$ nmol/gr yaş doku olarak tespit edildi (Şekil 4). II. ve III. grup arasındaki fark istatistiksel yönden anlamlıydı ($p < 0,001$). Tirofiban doku ATP seviyesindeki değişikliklerden anlaşılacağı üzere % 90,7 nöroprotektif etki göstermiştir.

TARTIŞMA

Dolaşımdaki trombositler, serebral arterlerdeki oklüzyon sonrası iskemik alan içerisinde aktive olurlar ve kümelenirler (13,14,20,40). Trombosit agregasyonunun ve lökosit adhesyonunun rol aldığı mikrovasküler obstrüksiyon, serebral arterlerdeki oklüzyonun bir sonucu olarak kabul edilir. Bu olayın primatlarda lokal iskemiyeye ve beyinin hücresel hasarına yol açtığı gösterilmiştir (14). Antiplatelet ajanlar serebral iskemide geçmişte sıkça kullanılmıştır (1,2,3,5). Halen de kullanılmakta olan bu ajanlar, trombosit aktivasyon yollarının adezyon veya agregasyonun üst basamaklarının inhibisyonu ve relatif bir trombosit agregasyonu blokajı sağlamakla birlikte nispeten yetersizdirler (9). Ayrıca rutinde kullanılan antiplatelet ve trombolitik ajanlarla tedavi sırasında serebral hemoraji riskinin olduğu gösterilmiştir (8,27). Bu çalışmada nöroşirürji pratiğinde sık karşılaşılan sorunlardan biri olan iskemide antiplatelet ajan olan tirofibanın etkileri incelenmiştir. Çalışmada, daha önceki araştırmalarda da kullanılan geçici ön beyin iskemisi modeli seçilmiştir (31,37,49). Geçici ön beyin iskemisi modeli, hayvanda spontan solunumu ve arteryel kan gazlarını bozmadan minimal bir iskemi oluşturduğu için tercih edilmiştir (19).

Trombositler subendotelial kollojen veya fibronektinin spesifik membran reseptörlerine hızla bağlanırlar. Trombosit aktivasyonundaki major membran reseptörleri bir çok alt grubu bulunan (GP) glikoproteinlerdir (43). GP IIb/IIIa kompleksi fibrinojen, fibronektin ve von Willebrand faktörü için temel bir reseptördür. Bu bağlantı spesifik olup irreversibledir. GP IIb/IIIa reseptörüne bağlantıyı irreversible olarak inhibe eden antiplatelet ajanlar (monoklonal antikolar gibi) anlamlı hemoraji riski

nedeniyle dezavantajlı olabilirler (22,24). Daha önceki çalışmalarda GP IIb/IIIa reseptör blokajının hayvan koroner ve karotid arter stenozu modellerinde tromboz ve retrombozu önlemede aspirinden daha etkili olduğu rapor edilmiştir (47,48,55). Ohman ve ark.'nın (39) yaptıkları klinik çalışmada integrilin ile akut myokard infarktüsünde reperfüzyonun düzeldiği gösterilmiştir (39). GP IIb/IIIa reseptör antagonistleri ile serebral iskemi modellerinde yapılan çalışmalar oldukça nadirdir. Kaku ve ark. (30) tarafından rat orta serebral arter trombozisi modelinde GP IIb/IIIa reseptör antagonistleri olan disintegrin ve triflavinin etkileri değerlendirilmiş ve serebral arteryel trombozisin önlenmesinde GP IIb/IIIa reseptör blokajının faydalı olabileceği gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada yine bir GP IIb/IIIa reseptör antagonisti olan TP 9201'in deneysel akut fokal serebral iskemide mikrovasküler koruyucu etkisinin bulunduğu ve yalnızca yüksek dozlarda parankimal hemoraji riski taşıdığı bildirilmiştir (1). Tarafımızdan yapılan literatür incelemesinde GP IIb/IIIa reseptör antagonisti olan tirofibanın serebral iskemide rolünü içeren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bir başka değişle, tirofibanın serebral iskeminin tedavisindeki etkinliği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

Tirofiban (N-(butylsulfonyl)-o-[4-(4piperidinyl)butyl]-L tyrosine monohydrochloride) fibrinojenin GP IIb/IIIa reseptörüne bağlanmasını reversibl olarak antagonize eden non-peptid bir moleküldür. Tirofiban doza ve konsantrasyona bağımlı olarak trombosit agregasyonunu inhibe eder. 30 dk. infüzyon sonunda % 90 'ın üzerinde bir inhibisyon sağladığı bildirilmektedir (42). Tirofiban ile sağlanan trombosit agregasyonu inhibisyonu, reversibl antagonistik etki sebebi ile infüzyonun kesilmesini takiben geri döndüğü ifade edilmektedir (42). Tirofiban daha önce King ve ark. (33) tarafından koroner anjioplasti sonrası hastalarda 36 saat boyunca infüzyon tarzında kullanılmış ve infüzyon süresince akut iskemik komplikasyonları azalttığı, bu etkisinin ilaç kesildikten birkaç gün sonra bile devam ettiği gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda, koroner sendromlu hastalarda tirofiban aspirin ve heparinle birlikte kombine edildiğinde, tek başına heparin ve aspirin verilen hastalara oranla iskemik hasarın anlamlı düzeyde azaldığı, tirofibanla bağlı intrakranyal hemoraji ve ölüm görülmediği, nadiren trombositopeni geliştiği ve bu komplikasyonun herhangi bir sekel bırakmadan kendiliğinden düzeldiği bildirilmiştir (11,17,42,44,45,57). Bu çalışmada tirofibanın iskemi sonrası serebral dokudaki nöroprotektif etkisi araştırılmıştır.

Biyokimyasal parametreler olarak serebral dokudaki lipit peroksidasyon, NO, SOD ve ATP düzeylerine bakılmıştır.

Doku MDA seviyeleri, serbest radikallerin rol oynadığı lipit peroksidasyonuna bağlı doku hasarı ve enerji metabolizmasındaki düşüşü yansıtır (36). Yapılan bir çok klinik ve deneysel çalışmada iskemi sonrası serebral dokuda MDA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (4,7,10,51,56). Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonu, doku kanlanmasının azalmasına bağlı ATP seviyelerinde düşme, hipoksi, hücre membran geçirgenliğinin bozulması, mitokondriyal hasar gibi nedenlerle hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışına bağlanmaktadır (53). Yavuz ve ark. (56) yaptığı bir deneysel çalışmada doku MDA düzeylerinin geçici serebral iskemiden sonra yükseldiği ve 2-chloroadenosine tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada, geçici ön beyin iskemisi ile doku MDA seviyelerinde % 80'lik bir artış gözlenmiş; bu artışın tirofiban tedavisi ile % 43 oranında azaldığı saptanmıştır (Şekil 1). Tirofibanın bu etkisini iskemi sonrası reperfüzyonu artırması, bunun sonucu olarak da oksidatif stresi azaltmasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Beyinde hem vasküler endotel, hem de nöronlar tarafından sentezlenen NO'nun, iskemide erken dönemde vazodilatatör etki ile serebral kan akımını artırırsa bile kalsiyum girişıyle indüklenen kalmoduline bağlı aşırı üretiminin nörotoksik etkiye yol açtığı bildirilmektedir (57). NO, bu nörotoksik etkisini bir çok farklı mekanizma ile (mitokondriyal elektron transport zinciri enzimlerini inhibe ederek mitokondriyal respirasyonu durdurması, proteinlerin nötralizasyonuna yol açması, DNA'nın deaminizasyonuna neden olması, DNA replikasyonunu inhibe ederek apoptozisi tetiklemesi, glikolitik olan gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek hücresel enerji üretimini durdurması ve lipit peroksidasyonunu şiddetlendirmesi gibi) oluşturduğu düşünülmektedir (12,26,35,54). Osuka ve ark. (41)'nın bir çalışmasında ratlarda reversibl orta serebral arter oklüzyonu sonrası iNOs aktivitesinin ve NO'in yükseldiği; tamoxifen tedavisi sonrası iNOS aktivitesinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada tirofiban verilmesiyle iskemiyile yükselmiş olan NO'nun, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü gösterilmiştir (Şekil 2). Tirofibanın bu etkisinin, oksidatif stresi önlemesi, mitokondriyal hasar ve dolayısıyla hücre içi kalsiyum salınımını azaltması

ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Serbest radikal süpürücülerinden olan SOD, mitokondride doğal olarak bulunan endojen antioksidan enzimlerden biri olup serebral iskemide oluşan süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirir. İşlekel ve ark. (28) tarafından, ratlarda deneysel serebral iskemi-reperfüzyon sonrası SOD aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. SOD, H₂O₂ ve diğer radikaller tarafından nötralize edilmektedir. Bu SOD düzeyindeki azalmayı açıklamakta ve oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Oksidatif hasara maruz kalmış enzimler proteolize daha yatkındır ve düşüşte rol oynarlar. Deng ve ark. (15) tarafından deneysel fokal serebral iskemi sonrası doku SOD aktivitesinin düştüğü, 3,6-dimethamidodibenzopyridonium gluconate tedavisi sonrası doku SOD aktivitesinin tekrar yükseldiği bildirilmiştir. Bu çalışmada geçici ön beyin iskemisi sonrasında düştüğü görülen SOD aktivitesinin, tirofiban tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyileştiği gösterilmiştir (Şekil 3). Tirofibanın bu iyileşmeyi reperfüzyonu artırması ile lipit peroksidasyonu ve serbest radikallerin oluşumunu önleyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

İskemik nörodejenerasyon, temelde kan akımıyla birlikte glikozun ve oksijenin kesilmesi sonrası nöron ve aksonlarda meydana gelen hücresel enerji yetersizliği ile ilgilidir (34). Hipoperfüzyon sonucu anoksi, mitokondri membranı boyunca kollaps yapar ve ATP'nin üretim kaynaklarını bozar. Pulsenelli ve ark. (46) yaptığı bir çalışmada geçici ön beyin iskemisi sonucu ATP seviyelerinin düştüğü bildirilmektedir. Kikkowa ve ark. (32) karotid arter ligasyonu ile oluşturulan serebral iskemide clentiazemin etkilerini incelemişler, iskemi ile serebral kan akımının % 5 azaldığını, bununla birlikte düşen ATP seviyelerinde düzelme olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada geçici ön beyin iskemisi uygulanmış ratlarda ATP seviyelerinin yüksek bir oranda düştüğü, tirofiban tedavisi sonrası ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ATP seviyelerinin düzeldiği görülmüştür (Şekil 4). Bu düzelmeyi, tirofiban verilmesi sonucu serebral kan akımının artması, nöronal oksijenlenmedeki artış ve mitokondriyal hasarın önlenmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak tirofibanın antiplatelet bir ajan olarak nöroprotektif etkinliğinin olduğu ve bazı üstünlükleri ile akut serebral iskemide halen

kullanımda olan diğer antiplatelet ajanlara alternatif olabileceği kanısına varılmıştır.

Yazışma adresi: Dr. Ahmet Çolak
Terakki Cad. No: 47/7
Kartaltepe, Bakırköy, İstanbul
Faks: 0 212 252 63 00
Tel: 0 212 252 43 00
E-mail: drahmetcolak@yahoo.com

KAYNAKLAR

1. Abumiya T, Fitridge R, Majur C, Copeland BR, Kozioł JA, Tschopp JF, Pierschbacher MD, del Zoppo GJ: Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular potency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke* 31: 1402-1410, 2000
2. Acheson J, Danta G, Hutchinson EC: Controlled trial of dipyridamole in cerebral vascular disease. *Br Med J* 1: 614-620, 1969
3. Barnett HJM: Transient cerebral ischemia: pathogenesis, prognosis and management. *Ann R Coll Physicians Surgeons Can* 7: 153-160, 1974
4. Barut Ş, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, Çökneşeli B, Kaya U: Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 16:53-59, 1993
5. Bednar MM, Gross CE: Antiplatelet therapy in acute cerebral ischemia. *Stroke* 30: 887-893, 1999
6. Buage JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 12: 302-310, 1978
7. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squidrito F, Inferrara G, Paris A, Rizzo A, Criafulli C, Fiore A, Caputi AP: Neuroprotective effects of Ginkgobiloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 67: 2673-2683, 2000
8. Clark WM, Madden KP, Lyden PD, Zivin JA: Cerebral hemorrhagic risk of aspirin or heparin therapy with thrombolytic treatment in rabbits. *Stroke* 22: 872-876, 1991
9. Collier BS: Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Ann Rev Med* 43: 171-180, 1992
10. Cuzzocrea S, Costantino G, Gitto E, Mazzon E, Fulia F, Serraino I, Cordoro S, Barberi I, De Sarro A, Caputi AP: Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *J Pneu Res* 29: 217-227, 2000
11. Dargas G, Colombo A: Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists in percutaneous coronary revascularization. *Am Heart J* 138: 16-23, 1999
12. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6368-6371, 1991
13. del Zoppo GJ, Copeland BR, Harker LA, Waltz TA, Zyroff J, Hanson SR, Battenberg E: Experimental acute thrombotic stroke in baboons. *Stroke* 17: 1254-1265, 1986
14. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang C-M: Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22: 1276-1283, 1991
15. Deng XL, Qian ZY, Liu NF, Ma XY, Wang HF, Hou ZJ: Antagonistic effect of 3,6-dimethylamido-dibenzopyridonium gluconate on lipid peroxidation in cerebral cortical neuronal cultures and rat brains during focal cerebral ischemia reperfusion. *Acta Pharmacol Sin* 21: 460-462, 2000
16. Easton JD: Antiplatelet therapy in the prevention of stroke. *Drugs* 42(Suppl 5): 39-50, 1991
17. Ferguson JJ, Lau TK: New antiplatelet agents for acute coronary syndromes. *Am Heart J* 135: 194-200, 1998
18. Fields WS, Lemak NA, Frankowski RF, Hardy RJ: Controlled trial of aspirin in cerebral ischemia. *Stroke* 8: 301-304, 1977
19. Fujishima M, Nakatomi Y, Tamaki K, Ogata J, Omae T: Cerebral ischaemia induced by bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive rats. Supra and infra tentorial metabolism and arterial acid-base balance. *J Neurol Sci* 33: 1-11, 1977
20. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ: Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (wistar rat). *Am J Pathol* 144: 188-199, 1994
21. Genetta TB, Mauro VF, Abciximab: a new antiaggregant used in angioplasty. *Ann Pharmacother* 30: 251-257, 1996
22. Gold HK, Gimple LW, Yasuda T, Leinbach RC, Werner W, Holt R, Jordan R, Berger H, Collen D, Collier BS: Pharmacodynamic study of F(ab')₂ fragments of murine monoclonal antibody 7E3 directed against human platelet glycoprotein GPIIb/IIIa in patient with unstable angina pectoris. *J Clin Invest* 86: 651-659, 1990
23. Grisham M, Johnson G, Gautreaux M, Berg R: Measurement of nitrate and nitrite in extracellular fluids: A window to systemic nitric oxide metabolism. *Methods Enzymol* 7: 84-90, 1995
24. Hansen SR, Pareti FI, Ruggery ZM, Narcec UM, Kunićki TJ, Montgomery RR, Zimmerman TS, Harker LA: Effect of monoclonal antibodies against the glycoprotein IIb/IIIa complex on thrombosis and hemostasis in the baboon. *J Clin Invest* 81: 149-158, 1988
25. Hass WK, Easton JD, Adams HP Jr, Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S, Kamm B: A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. *N Eng J Med* 321: 501-507, 1989
26. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Frishman MC, Moskowitz MA: Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885, 1994
27. International Stroke Trial Collaborative Group. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19,435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 349: 1569-1681, 1997
28. İşlekel S, İşlekel H, Güner G, Ozdamar N: Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res Exp Med (Berl)* 199: 167-176, 1999

29. Iwasaki Y, Ito S, Suzuki M, Nagahori T, Yamamoto T, Konno H: Forebrain ischemia induced by temporary bilateral common carotid occlusion in normotensive rats. 90: 155-165, 1989
30. Kaku S, Umemura K, Mizuno A, Kawasaki T, Nakashima M: Evaluation of the disintegrin, triflavin, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. Eur J Pharmacol 321: 301-305, 1997
31. Kawamoto T, Ikeda Y, Teramoto A: Protective effect of L-histidine (single oxygen scavenger) on transient forebrain ischemia in the rat. No To Shinkei 49: 612-618, 1997
32. Kikkowa K, Yamauchi R, Suzuki T, Banno K, Murata S, Tetsuka T, Nagao T: Effects of clentiazem on cerebral ischemia induced by carotid artery occlusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Stroke 25: 424-480, 1994
33. King SB: Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. Circulation 96: 1445-1453, 1997
34. Kinuta Y, Kimura M, Itakawa Y, Ishikawa M, Kikuchi H: Changes in xantine oxidase in ischemic rat brain. J Neurosurg 71: 417-420, 1989
35. Kluchova D: Neurodegeneration and NO. Bratisl Lek Listy 100: 144-148, 1999
36. Lazzarino G, Vagnozzi R, Tavazzi B, Pastore FS, Di Pierro D, Siragusa P, Belli A, Giuffr  R, Giardina B: MDA, oxypurines, and nucleosides relate to reperfusion in short-term incomplete cerebral ischemia in the rat. Free Radic Biol Med 13: 489-498, 1992
37. Lee JY, Kim YH, Koh JY: Protection by Pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. J Neurosci 21: RC171, 2001
38. Mori E, Chambers JD, Copeland BR, Arfors K-E, del Zoppo GJ: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia. Stroke 23: 712-718, 1992
39. Ohman EM, Kleiman NS, Gacjoch G, Worley SJ, Navetta FI, Talley JD, Anderson HV, Ellis SG, Cohen MD, Spriggs D, Miller M, Kereiakes D, Yakubov S, Kitt MM, Sigmon KN, Califf RM, Krucoff MW, Topol EJ: Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with integrilin in acute myocardial infarction: Results of a randomized, placebo-controlled, dose ranging trial: IMPACT-AMI Investigators. Circulation 95: 846-854, 1997
40. Okoda Y, Copeland BR, Mori E, Tung M-M, Thomas WS, del Zoppo GJ: P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. Stroke 25: 202-211, 1994
41. Osuka K, Feustel PJ, Mongin AA, Tranmer BI, Kimelberg HK: Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurochem 76: 1842-1850, 2001
42. Peerlinck K, Lepeleire D, Goldberg M, Farrell D: MK-383 (L-700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, is active in man. Circulation 88: 1512-1517, 1993
43. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruasiahiti E, Marguerie GA, Ginsberg MH: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. Proc Natl Acad Sci USA 82: 8057-8061, 1985
44. PRISM: A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. N Engl J Med 21: 1498-1505, 1998
45. PRISM-PLUS: Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. N Eng J Med 338: 1488-1497, 1998
46. Pulsinelli WA, Duffy TE: Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. J Neurochem 40: 1500-1503, 1983
47. Rote WE, Werns SW, Davis JH, Feigen LP, Kilgore KS, Lucchesi BR: Platelet GPIIb/IIIa receptor inhibition by SC-49992 prevents thrombosis and rethrombosis in the canine carotid artery. Cardiovasc Res 27: 500-507, 1993
48. Schror K: Antiplatelet drugs: a comparative review. Drugs 50: 7-28, 1995
49. Schubert P, Keutzbeg GW: Cerebral protection by adenosine. Acta Neurochir Suppl (Wien) 57: 80-88, 1993
50. Stribos PJ: Nitric oxide in cerebral ischemic neurodegeneration and excitotoxicity. Crit Rev Neurobiol 12: 223-243, 1998
51. Stulinsky SL, Dobrota D: Anti-ischemic activity of carnosine. Biochemistry (Mosc) 65: 849-855, 2000
52. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34: 497-500, 1988
53. Tymianski M, Tator CH: Normal and Abnormal Calcium Hemostasis in Neurons: A Basis for the Pathophysiology of Traumatic and Ischemic Central Nervous System Injury. Neurosurg 38: 1176-1195, 1996
54. Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD: Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. Neurosurgery 43: 1427-1436, 1998
55. Yasuda T, Gold HK, Fallon JT, Leinbach RC, Guerrero JL, Scudder LE, Kanke M, Shealy D, Ross MJ, Collen D, Collier BS: Monoclonal antibody against the platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor prevents coronary artery reocclusion after reperfusion with recombinant tissue-type plasminogen activator in dogs. J Clin Invest 81: 1284-1291, 1988
56. Yavuz O, Turkozkan N, Bilgihan A, Dogulu F, Aykol S: The effect of 2-chloroadenosine on lipid peroxide level during experimental cerebral ischemia-reperfusion in gerbils. Free Radical Biol Med 22: 337-341, 1997
57. Zhao X, Theroux P, Snapinn SM, Sax FL: Intracoronary thrombus and platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with tirofiban in unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. Circulation 100: 1609-1615, 1999