

Siklosporin A'nın sıçan femoral arterinde kronik morfolojik vazospazm üzerine etkisinin morfometrik olarak araştırılması

Morphometric evaluation of the effect of cyclosporine A on chronic morphologic vasospasm in rat femoral artery

Mustafa ERDAL, A. Celal İPLİKÇİOĞLU, Zafer BERKMAN, Murat COŞAR, Cem A. GÖKDUMAN

SSK Okmaydanı Eğitim Hastanesi Nöroşirürji Kliniği

AMAÇ

Bu çalışmada siklosporin A'nın bir immünsupresif ajan olarak sıçan femoral arterinde oluşturulan vazospazmdaki etkisi araştırıldı.

ÇALIŞMA PLANI

Sprague-Dawley cinsi 60 erkek sıçan 30'arlık deney ve kontrol gruplarına ayrıldı. Her grup kendi içinde vazospazm oluşturulan, vazospazm oluşturulmayan ve ameliyat edilmeyenler olarak üç alt gruba ayrıldı. Vazospazm modelinin uygulandığı gün deney grubundaki sıçanlara oral yoldan 10 mg/kg siklosporin A verildi. Yedi gün sonunda sıçanlar intraperitoneal derin ketamin anestezisi ile öldürüldü ve femoral arterlerinden alınan damar kesitleri doku hazırlığından sonra mikroskop ile incelendi; morfometrik analiz için fotoğrafları çekildi. Damar duvar kalınlıkları ve lümen alanı verileri karşılaştırıldı.

BULGULAR

Kontrol grubunda vazospazm oluşturulan sıçanların arterlerinde lümen çapında anlamlı derecede azalma, buna karşın damar duvar kalınlıklarında artma gözlemlendi. Vazospazm oluşturulduktan sonra siklosporin A verilen sıçanlarda ise damar duvar kalınlıklarındaki artışın gerilediği ve lümen çapında artış olduğu görüldü. Düz kas hücrelerinde, siklosporin A verilmeyen vazospazm grubunda görülen vakuolizasyonun azaldığı saptandı. Lümen alanları ve damar duvar kalınlıkları siklosporin A verilen vazospazm modelinde diğer gruplara göre anlamlı farklılıklar gösterdi.

SONUÇ

Siklosporin A'nın sıçan femoral arterinde kronik arteriyel vazospazmın gelişmesini önlediği görüldü.

Anahtar sözcükler: Siklosporin; hastalık modeli, hayvan; femoral arter; sıçan; subaraknoid kanama; vazokonstriksiyon.

OBJECTIVES

In this study, the effect of cyclosporine A, an immunosuppressive agent, was investigated on vasospasm induced in rat femoral artery.

STUDY DESIGN

Sixty male Sprague-Dawley rats were divided into study and control groups, equal in size. Each group was then assigned to three subgroups, namely, rats with or without arterial vasospasm, and no-operation. Following vasospasm induction, all the study rats were administered an oral dose of 10 mg/kg cyclosporine A. Seven days later the rats were sacrificed under ketamine anesthesia, tissue sections from femoral arteries were obtained, prepared, and stained for microscopic examination. The samples were photographed for measuring arterial wall thickness and lumen diameter.

RESULTS

Arterial lumen diameters were significantly decreased, and arterial wall thickness was significantly increased in vasospasm-induced control rats. However, cyclosporine A-treated rats following vasospasm exhibited significantly less arterial wall thickness and greater lumen diameters, with less vacuolization compared to the smooth-muscle cells of vasospasm-induced control rats. Measurements of arterial wall thickness and lumen diameters showed significant differences in cyclosporine A-treated rats following vasospasm.

CONCLUSION

The results show that cyclosporine A is effective in the prevention of chronic arterial vasospasm in rat femoral artery.

Key words: Cyclosporine; disease models, animal; femoral artery; rats; subarachnoid hemorrhage; vasoconstriction.

• Geliş tarihi: 10.03.2003 Düzeltme: 13.08.2003 Kabul tarihi: 03.11.2003

• İletişim adresi (Reprint requests to): Dr. Mustafa Erdal, Kadipaşa Sok., Tansev Apt., No: 5, D: 12, 34736 Kazasker, İstanbul.
Tel: 0212 - 221 77 77 / 1277 Faks: 0216 - 411 62 52 e-posta: muster@superonline.com

Serebral vazospazm, subaraknoid kanama (SAK) sonrası ölüm ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir.⁽¹⁾ Konuyla ilgili birçok çalışma olmasına karşın, vazospazmın tedavisi ile ilgili sonuçlar tam olarak belli değildir. Son yıllarda vazospazmıda immün yanıtın ve enflamasyonun etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Vazospastik arter duvarında IgG depolarının varlığı ve kanda dolaşan immün komplekslerin görülmesinin vazospazmın şiddetiyle ilişkisi değerlendirilmiştir.^(2,3) Günümüzde enflamasyon ve immün yanıtın vazospazmdaki etkisi konusunda araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, humoral bağışıklığı engelleyen, hücresel bağışıklığı baskılayan, günümüzde organ transplantasyonlarında sıkça kullanılan bir ajan olan siklosporin A'nın vazospazmdaki etkisi araştırıldı.^(2,4)

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için SSK Okmeydanı Hastanesi Etik Kurulu başkanlığından onay alındıktan sonra, Sprague-Dawley cinsi, 155-195 gr ağırlığındaki 60 erkek sıçana intraperitoneal yolla 2 mg/kg ketamin HCl anestezisi uygulandı. Sıçanlar 30'ar adet olmak üzere deney ve kontrol olarak iki gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde vazospazm oluşturulan (M₁), vazospazm oluşturulmayan (M₂) ve ameliyat edilmeyenler olarak üç alt gruba ayrıldı.

Sağ femoral arterleri M₁ modeli olarak kullanılan sıçanların proksimal femoral arterlerinden mikroskobik olarak yaklaşık 1 cm'lik bir kesit ortaya konarak önceden hazırlanan yaklaşık 1 cm²'lik silastik kılıflardan birer adet damarın adventisyası çevresine yerleştirildi. Daha sonra sıçanlardan intrakardiyak olarak alınan otolog 0.1 ml tam kan, kılıf ile adventisya arasına yerleştirilip dikildi. Aynı işlemler M₂ modeli olarak kullanılan sol femoral arterler için de yapıldı; ancak otolog kan konmadı. İki grupta da 15'er sıçanın sol bacaklarına işlem yapılmadı.

Vazospazm modelinin uygulandığı gün, aynı saatlerde deney grubundaki sıçanlara oral yoldan bir günde aldıkları su içine eşit dağıtılmış şekilde 10 mg/kg siklosporin A (Sandimmune® Oral Solution, İsviçre) verildi. Kontrol grubundaki sıçanlar yedi gün normal bakıma alındı. Birinci hafta sonunda sıçanlar tekrar tartıldı ve ağırlıklarında anlamlı değişiklik olmadığı görüldü. Sıçanlar intraperitoneal derin ketamin anestezisi ile öldürüldükten sonra insizyon yerlerinden kolayca açılarak femoral arterdeki silastik kılıflara ulaşıldı. Bu sırada

sıçanların toraksı eksplere edildi. Perikard açılarak sol ventrikül bulundu ve ponksiyon yardımıyla ventriküle girilerek ponksiyon setinin bir ucuna serum seti bağlandı. Bu yoldan fizyolojik arter basıncında, 100 ml 0.03 M fosfat tampon (pH 7.4), 200 ml %4'lük paraformaldehit ve %1'lik gluteraldehit çözeltisi karıştırılmış halde geniş hacimli bir enjektör yardımıyla sol ventriküle verildi. Verilen çözelti tüm damar sisteminde dolaşımdan sonra sol atriyumdan drene oldu.

Tüm gruplara standart uygulanan bu işlem sonrasında, deney ve kontrol grubundaki tüm sıçanların femoral arterlerinden damar kesitleri yaklaşık 1 cm'lik bölümler halinde çıkarılarak %10'luk formaldehit tampon çözeltisi içine alındı. Elde edilen dokular dehidrate edilip ksilen ve parafin ile işleminden geçirildi. Mikrotom ile 5 mikron kalınlıkta kesitler alınarak etüvde 60 derecede parafinden arındırıldı. Bu işlem, ksilen ile üç kez tekrarlanarak dereceli alkolden geçirilip rehidratasyon tamamlandı. Hazırlanan preparatlar su ile tekrar yıkılarak hematoksilin-eozin ile boyandı ve x100 büyütmede Olympus Bx7 mikroskop ile incelendi; morfolojik analiz için fotoğrafları çekildi. Lümen alanlarının hesaplanması için, A4 boyutunda bir aydınlatıcı kağıdı ile milimetrik kağıdın üst üste konmasından oluşturulan bir ölçüm kağıdı hazırlandı ve fotoğraflar üzerine yerleştirildi. Lümen içinde kalan milimetrik kareler tek tek sayıldı ve kağıt üzerinde 500 adet milimetrik kare bir birim ölçek kabul edilerek toplam lümen alanı hesaplandı. Bu hesaplamada kullanılan birim değer damar kalınlığı için de kullanılarak iki değer birbirleriyle uyumlu olması amaçlandı. Çalışmanın ana temasını oluşturan bu iki ana değer birbirileriyle ilişkilendirilerek, damar duvar kalınlıkları ve lümen alanı verilerine ait ortalama değerler Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde ameliyat yapılmayan grubun damarlarında ince ve kıvrım yapmayan lamina elastika interna, 5-10 tabaka halinde düz kas hücreleri ve media tabakasında ince elastik lamina gözlemlendi (Şekil 1a).

Işık mikroskobunda, kontrol grubu M₁ modelindeki sıçanların arterlerinde lümen çapında anlamlı derecede azalma, buna karşın damar duvar kalınlıklarında artma gözlemlendi (Şekil 1b). Düz kas hücrelerinde vakuolizasyon ve çok sayıda

makrofaj belirlendi. Endotel hücrelerinin birbirleri ile sıkı bağlantılarına rağmen, lamina elastika internanın lümen içine doğru uzandığı görüldü. Vazospazm oluşturulan modellerde bir hafta oral siklosporin A verilen sıçanların ışık mikroskobu ile femoral incelemelerinde, damar duvar kalınlığındaki artışın gerilediği ve lümen çapında artış olduğu gözlemlendi (Şekil 1c, 1d). Endotel hücrelerinin sıkı bağlantılarında yer yer çözümler vardı; düz kas hücrelerinde siklosporin A verilmeyen vazospazm grubunda görülen vakuolizasyonun azaldığı saptandı.

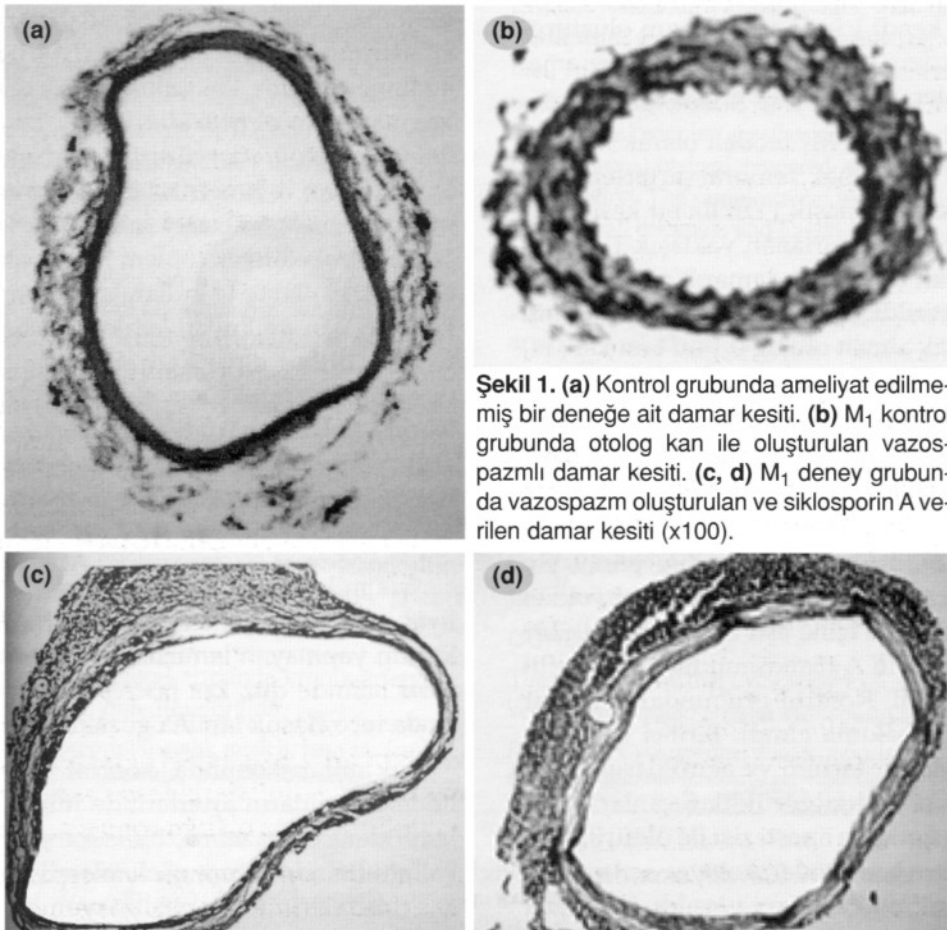
Damar duvar kalınlıkları ve lümen alanı verileri Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırıldı (Tablo I). Milimetrik karelerin tek tek sayılması ile lümen alanları ve damar duvar kalınlıkları hesaplandığında, siklosporin A verilen vazospazm modelinde diğer gruplara göre anlamlı farklılıklar görüldü.

TARTIŞMA

Serebral vazospazmın patofizyolojisi karmaşık ve çok faktörlüdür. İnsan nekropsi çalışmalarında

ve deneysel araştırmalarda, SAK'dan sonra makrofajlar, nötrofiller ve diğer enflamatuvar hücrelerin intimal, medial ve subaraknoid uzaklığa infiltrasyonları bildirilmiştir.^[5-10] Enflamasyonun SAK'dan sonra, vasküler yanıtın ve beraberinde serebral vazospazmın gelişiminde uzun dönemde rol oynadığı düşünülmektedir.^[10] Deneysel çalışmaların gösterdiği gibi, SAK'da, başka hücresel işlemlerin yokluğunda serebral arterler üzerinde gelişen perivasküler şiddetli enflamasyon çok hafif dereceden şiddetli dereceye kadar devam eden vazospazma neden olabilir.^[2-4,10,11]

On bir aminoasitten oluşan bir siklik endopeptid olan siklosporin A, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak primer immün stimülasyonun derin inhibisyonuna neden olmaktadır.^[4] Yapılan çalışmalar siklosporin A'nın hücre aracılı reaksiyonların gelişmesini ve T hücresine bağımlı antikor oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir.^[2,4] Ayrıca, interlökin-2 de dahil olmak üzere lenfokin üretimini ve serbestlenmesini inhibe etmektedir.^[2] Siklosporin A'nın hücre siklusunun G₀ ya da G₁ fazlarında



Şekil 1. (a) Kontrol grubunda ameliyat edilmiş bir deneğe ait damar kesiti. (b) M₁ kontrol grubunda otolog kan ile oluşturulan vazospazmlı damar kesiti. (c, d) M₁ deney grubunda vazospazm oluşturulan ve siklosporin A verilen damar kesiti (x100).

TABLO I

Gruplar arasında lümen alanı ve damar duvar kalınlıklarının karşılaştırılması

	Femoral arter sayısı	Siklosporin A	Lümen alanı (ort.±SS) (Toplam milimetrik kare)	Duvar kalınlığı (ort.±SS) (Toplam milimetrik kare)
Deney grubu				
Vazospazm var (M ₁)	30	Var	4647.9±1001.0	5.220±1.142
Vazospazm yok (M ₂)	15	Var	5586.4±675.66	2.893±0.8102
İşlemsiz	15	Var	5259.9±733.61	3.013±0.7337
Kontrol grubu				
Vazospazm var (M ₁)	30	Yok	396.40±236.90	8.990±1.657
Vazospazm yok (M ₂)	15	Yok	5647.7±499.00	3.353±0.8927
İşlemsiz	15	Yok	5159.7±770.35	3.833±0.8981
Mann-Whitney U-testi (U' ve p)				
Kontrol M ₁ -Kontrol M ₂			U'=450.00; p<0.0001	U'=450.00; p<<0.0001
Kontrol M ₁ -Kontrol işlemsiz			U'=450.00; p<0.0001	U'=450.00; p<<0.0001
Kontrol M ₁ -Deney M ₁			U'=900; p<0.0001	U'=891.50; p<<0.0001

dinlenme halindeki lenfositleri bloke ettiği görülür; aktif T hücrelerinin antijen uyarımlı lenfokin salınımı inhibe olur. Siklosporin A, kalsinörin ve fosfodiesteraz aktivitesini de inhibe eder; nitrik oksit oluşumunu artırır; glutamata bağlı nörotoksisteye karşı nöronları korur. Siklosporin A lenfokinlerin, özellikle interlökin-2'nin salınmasını inhibe eder; böylece sitotoksik T hücrelerinin oluşumu önlenmiş olur.^[2]

Pelletieri ve ark.^[11] tarafından SAK sonrası vazospazmda kanda dolaşan immün komplekslerin varlığının bildirilmesiyle başlayan immünolojik araştırmalar, Peterson ve ark.nın^[4] siklosporin A'nın köpekler üzerinde çift kanamalı SAK modelinde anjiyografik olarak vazospazmı geriletmediğini bildiren yayını ile iyice yoğunlaşmıştır. Ryba ve ark.^[12] tavşanların serebral damarları üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada siklosporin A'nın vazospazmı önlediği sonucuna varmışlardır. Daha sonra Handa ve ark.^[13] maymunların serebral arterleri üzerinde yaptıkları çalışmada, oluşturdukları tek kanamalı SAK modelinde kontrol grubu ile siklosporin A uygulanan grubu birinci ve yedinci gün anjiyografik olarak değerlendirmişler; siklosporin A'nın vazospazmın şiddetini azaltabildiği, fakat komplikasyonları göz önüne alındığında terapötik etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır.

Nagata ve ark.^[2] köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada, oluşturdukları SAK modelinde immün baskılayıcı bir ajan olan FK-506, siklosporin A ve kontrol grubunu kronik vazospazm açısından kar-

şılaştırmışlar; üç grup arasında histolojik açıdan anlamlı farklılık bulamamışlardır.

Yanamoto ve ark.^[14] tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada tek kanamalı SAK modelinde siklosporin A kullanmışlar; fakat vazospazmı önlemede başarılı olamamışlardır. Elde ettikleri sonuçları Peterson ve ark.nın^[4] bulguları ile karşılaştırdıklarında, tek kanamalı modelin ikinci gününde damar duvarında T hücre yanıtı gözlememişler; Peterson ve ark.nın çift kanamalı SAK modelinde damar duvarında gözledikleri T hücrelerin ise siklosporin A'nın bu hücrelere karşı yanıtından kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.^[14]

Konu ile ilgili yapılmış klinik araştırmalarda olumlu veya olumsuz çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Ryba ve ark.^[15] SAK geçiren hastalar üzerinde yaptıkları klinik çalışmada, ilk 72 saatte kliplenen anevrizmalarda siklosporin A kullanılan hastaların nörolojik durumlarının kullanılmayanlara oranla anlamlı derecede daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Manno ve ark.^[16] dokuz adet Fischer grade üç SAK geçiren ve klip kullanılarak ameliyat edilen hastalarda 14 gün boyunca siklosporin A kullanmışlar ve siklosporin A'nın etkisini iki taraflı orta serebral arter üzerindeki akım yoğunluğunu ölçerek değerlendirdiklerinde vazospazmı önlemedeki rolünün yetersiz olduğu sonucuna varmışlardır.

İmmün supresyonun vazospazmın şiddetini azaltmada düşük etkinlik göstermesi, serebral va-

zospazmın patogeneğinde immün sistemin rolünün düşük olduğunu düşündürür.^[13] Serebral vazospazmın gelişmesinde immünolojik reaksiyonlardan çok, kanla kaplı alandaki diğer patojenik ajanların kuvvetli bir etken olduğu söylenebilir.^[13] Birçok çalışmada belirlenen ilaç etkisi farklı olabilir; buna neden olarak, kullanılan farklı türler, ilacın uygulanmasındaki değişik yollar ya da immün baskılayıcı ilaçların farklı etki mekanizmaları öne sürülebilir.^[13] Olumsuz sonuç veren klinik çalışmalar yüksek dereceli hastalığı olan olgulardan ve az sayıda hastadan oluştuğundan bildirilen sonuçlar tartışmalıdır.^[13] Bugün için SAK'dan sonra oluşan vazospazmın patogeneğinde immün yanıtın spesifik rolü belirsizliğini hala korumaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler, siklosporin A'nın sıçan femoral arter modeli üstünde, kronik vazospazmın morfometrik olarak gelişimini engellediğini göstermektedir. Ancak, kesin sonuçlar için daha geniş ve randomize çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Chyatte D, Fode NC, Nichols DA, Sundt TM Jr. Preliminary report: effects of high dose methylprednisolone on delayed cerebral ischemia in patients at high risk for vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1987;21:157-60.
2. Nagata K, Sasaki T, Iwama J, Mori T, Iwamoto S, Nirei H, et al. Failure of FK-506, a new immunosuppressant, to prevent cerebral vasospasm in a canine two-hemorrhage model. *J Neurosurg* 1993;79:710-5.
3. Ostergaard JR, Kristensen BO, Svehag SE, Teisner B, Miletic T. Immune complexes and complement activation following rupture of intracranial saccular aneurysms. *J Neurosurg* 1987;66:891-7.
4. Peterson JW, Nishizawa S, Hackett JD, Bun T, Teramura A, Zervas NT. Cyclosporine A reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in dogs. *Stroke* 1990;21:133-7.
5. Alksne JF, Branson PJ, Bailey M. Modification of experimental post-subarachnoid hemorrhage vasculopathy with intracisternal plasmin. *Neurosurgery* 1986;19:20-5.
6. Asano T, Takakura K, Sano K, Kikuchi H, Nagai H, Saito I, et al. Effects of a hydroxyl radical scavenger on delayed ischemic neurological deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a multicenter, placebo-controlled double-blind trial. *J Neurosurg* 1996;84:792-803.
7. Bell TE, LaGrange KM, Maier CM, Steinberg GK. Transcranial Doppler: correlation of blood velocity measurement with clinical status in subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Nurs* 1992;24:215-9.
8. Chyatte D, Sundt TM Jr. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Mayo Clin Proc* 1984;59:498-505.
9. Dilraj A, Botha JH, Rambiritch V, Miller R, Van Dellen JR. Levels of catecholamine in plasma and cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1992;31:42-50.
10. Peterson JW, Kwun BD, Hackett JD, Zervas NT. The role of inflammation in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 1990;72:767-74.
11. Pellettieri L, Nilsson B, Carlsson CA, Nilsson U. Serum immunocomplexes in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 1986;19:767-71.
12. Ryba M, Iwanska K, Walski M, Pastuszko M. Immunomodulators interfere with angiopathy but not vasospasm after subarachnoid haemorrhage in rabbits. *Acta Neurochir* 1991;108:81-4.
13. Handa Y, Hayashi M, Takeuchi H, Kobayashi H, Kawano H, Kabuto M. Effect of cyclosporine on the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery* 1991;28:380-6.
14. Yanamoto H, Kikuchi H, Okamoto S. Effects of protease inhibitor and immunosuppressant on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Surg Neurol* 1994;42:382-7.
15. Ryba M, Pastuszko M, Iwanska K, Bidzinski J, Dziewiecki C. Cyclosporine A prevents neurological deterioration of patients with SAH-a preliminary report. *Acta Neurochir* 1991;112:25-7.
16. Manno EM, Gress DR, Ogilvy CS, Stone CM, Zervas NT. The safety and efficacy of cyclosporine A in the prevention of vasospasm in patients with Fisher grade 3 subarachnoid hemorrhages: a pilot study. *Neurosurgery* 1997;40:289-93.