

İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ AZALTIKMASINDA PENTOKSİFİLİNİN SİALİK ASİT ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

THE EFFECT OF PENTOXIFYLLINE ON SIALIC ACID IN IMPROVEMENT OF ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

Dr. Öcal BERKAN, Dr. Metin AKSOY, *Dr. Öge ÇETİNKAYA, *Dr. Yavuz TİLİĞ, Dr. Şinasi MANDUZ,
Dr. Kasım DOĞAN, Dr. İlhan GÜNAY

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, SİVAS
*Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Kliniği, SİVAS

Adres: Dr. Öcal BERKAN, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, 58140 / Sivas

Sunulduğu Kongre: VI. Ulusal Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Kongresi, 21 - 25 Ekim 2000, ANTALYA

Özet

Amaç: Sialik asit, serum ve dokularda bulunan glikolipid ve glikoproteinlerin terminal oligosakkarit zincirlerinin önemli bir komponentidir. Bu çalışmada, ratlarda akut iskemiyeye bağlı olarak oluşan sialik asit düzeylerindeki değişiklikler ve pentoksifilin bu değişikliklere bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Materyal ve Metod: Kırk yedi adet rat, kontrol grubunu oluşturan Grup 1 ve çalışma grubunu oluşturan Grup 2 olarak önce ikiye, daha sonra da her iki grup iskemiyeye ve reperfüzyon zamanına göre t0, t1, t2 diye üçer alt gruba ayrıldı. Grup 2'deki bütün ratlara 50 mg/kg dozunda iv olarak pentoksifilin verildi.

Bulgular: İskemi safhasını gösteren t1 ve revaskülarizasyon safhasını gösteren t2 zamanındaki değerler incelendiğinde sialik asit, laktat ve kreatin kinaz değerlerinde, hiçbir işlem yapılmayan t0 sürelerindeki değerlere göre anlamlı değişiklikler gözlemlendi. İskemi ve revaskülarizasyon sırasındaki artmış olan total sialik asit değerleri, çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p < 0.05$).

Sonuç: Çalışma grubunda total sialik asit değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunması, pentoksifilin etkisine bağlandı.

Anahtar kelimeler: Sialik asit, iskemiyeye, reperfüzyon, pentoksifilin

Summary

Background: Sialic acid is an important component of terminal oligosaccharide chains of glycolipids and glycoproteins. The aim of this study was to investigate the alterations of sialic acid levels due to acute ischemia and the effect of pentoxifylline on these alterations.

Methods: Forty-seven rats were divided into 2 groups as control (Group 1) and study group (Group 2) and then each group was divided into 3 subgroups as t0, t1, and t2. To the rats in the study group, pentoxifylline 50 mg/kg was administered intravenously.

Results: Sialic acid, lactate and creatine kinase values were significantly higher in the duration of t1 indicating ischemia period and t2 indicating revascularization period when compared to t0. Total sialic acid values in the study group, which were increased during ischemia and revascularization, were found significantly lower than those of control group ($p < 0.05$).

Conclusions: We concluded that the lower values of total sialic acid in the study group might be due to the effect of pentoxifylline.

Keywords: Sialic acid, ischemia, reperfusion, pentoxifylline

Giriş

Sialik asit (SA) memelilerde geniş bir yayılım gösteren nörominik asidin asitlenmiş bir ailesidir [1]. 1936 yılında Blix tarafından sığırın submaksiller glandından elde edilen maddeden izole edilmiştir. SA serum ve dokularda hormon ve enzimlerde bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin bir parçasıdır [1,2]. Serum SA düzeyindeki değişiklikler eritrositlerin bütünlüğündeki, permeabilitesindeki ve viabilitesindeki değişiklikleri de yansıtmaktadır [3,4]. Bu değişiklikler hücre hasarına ve çeşitli komplikasyonların oluşumuna yol açabilmektedir. Yapılan birçok çalışma serum total SA değerlerinin kardiyovasküler hastalıklarda ve akut miyokard enfarktüsünde belirgin olarak yükseldiğini ortaya koymuştur [5,6]. Ayrıca aterosklerotik periferik damar hastalıklarında ve albuminüri ile seyreden vasküler hasarlı olgularda yüksek serum SA düzeyleri tespit edilmiştir [7,8]. Bu çalışmamızda ratlarda, akut iskemiyeye bağlı olarak oluşan total SA düzeyleri üzerindeki değişiklikleri ve pentoksifilin bu değişikliklere bir etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Materyal ve Metod

Ağırlıkları 193 - 206 gram arasında olan, aynı ortamda yaşamış ve aynı şekilde beslenmiş 47 adet Wistar albino cinsi rat çalışmaya alındı. Ratlar kontrol (Grup 1) ve pentoksifilin verilen çalışma grubu (Grup 2) olarak önce ikiye, daha sonra da her iki grup t0, t1, t2 diye üçer alt gruba ayrıldı. Grup 1'de 8 rata sadece anestezi verildi (t0), 8 ratta 4 saatlik iskemiyeye oluşturuldu (t1), diğer 8 ratta ise 4 saatlik iskemiyeden sonra 1 saat reperfüzyon uygulandı (t2). Grup 2'de yine aynı şekilde 8 rata sadece anestezi verildi (t0), 8 ratta 4 saatlik iskemiyeye oluşturuldu (t1), 7 ratta ise 4 saatlik iskemiye sonra 1 saat reperfüzyon oluşturuldu (t2).

Ratların tümünün anestezisi Ketamine HCl (Ketalar-Eczacıbaşı) 40 mg/kg + ylazine (Rompun-Bayer) 5 mg/kg intramusküler olarak uygulandı. İşlem boyunca ratlar, solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu.

Grup 1'deki ratlara hiçbir ilaç verilmezken, Grup 2'deki bütün ratlara 50 mg/kg dozunda iv olarak 15 dak süre ile yavaş

infüzyon şeklinde pentoksifilin verildi. Anestezi sonrasında batın yaklaşık 4 cm'lik orta hat insizyonla ksifoidin hemen altından pubisin 0.5 cm üzerine kadar açıldı. t0 alt grubunda yer alan ve sadece anestezi verilen ratlarda batın açıldı ve hiçbir girişim yapılmadan tekrar 4/0 atravmatik sütür ile kapatıldı. Bu işlemin hemen ardından kan örnekleri alındı. t1 alt grubunda yer alan ve iskemi oluşturulan gruplarda batın açıldıktan sonra infrarenal aortaları kleplendi (vascu stadd mini-scalan) ve batın kapatıldı. 4 saatlik iskemi süresinin sonunda kan örnekleri alındı. t2 alt grubunda yer alan ratların iskemi süresi sonunda batın sütürleri alınarak aortadaki klempler kaldırıldı ve batın tekrar kapatılarak 1 saatlik reperfüzyon süresi bekledi ve bu süre sonunda kan örnekleri alındı.

Total SA, laktat ve kreatin kinaz (KK) ölçümleri için kan örnekleri alındı. Bu kan örnekleri steril biyokimya tüplerine alınarak +4°C'de 2 saat bekletildikten sonra, 4000 devir/dak hızla santrifüje edildiler. Elde edilen serumlar steril şartlarda ve derin dondurucularda -20°C'de analizleri yapılarak saklandılar. Elde edilen bu kan örneklerinden total SA düzeyleri enzimatik yöntemle spektrofotometrik olarak, laktat düzeyleri enzimatik kit (Bohringer Mannheim GmbH, Mannheim Germany) kullanılarak, KK ise KK Nak (bio-clinica) kiti ve otoanalizör kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel analiz Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen değerler her parametrenin kendi grubu arasında ve diğer grupla kıyaslanarak yapıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Grup 1'deki total SA değerlerinde t0 ile t1 ve t2 süreleri arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). Ayrıca t1 ve t2 arasındaki fark da anlamlıydı ($p < 0.05$). Grup 2'deki total SA değerlerinde de t0 ile t1 ve t2 arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). Aynı şekilde t1 ve t2 arasındaki fark da anlamlıydı ($p < 0.05$).

Total SA değerlerini Grup 1 ve Grup 2 açısından karşılaştırdığımızda, Grup 1 ve Grup 2'nin t0 değerleri arasında fark görülmedi (Tablo 1). Grup 1 ve Grup 2'nin t1 değerleri karşılaştırıldığında fark anlamlıydı ($p < 0.05$). Grup 1 ve Grup 2'nin t2 değerleri karşılaştırıldığında da fark anlamlı olarak bulundu ($p < 0.05$).

Laktat değerlerini incelediğimizde hem Grup 1, hem de Grup 2'de (Tablo 2), t1 ve t2 zamanlarındaki değerlerde t0'a göre belirgin bir artış görülmüştür ($p < 0.05$). Laktat değerlerini Grup 1 ve Grup 2 açısından karşılaştırmalı olarak

	Grup 1	Grup 2
t0	49.11	48.98
t1	53.82	56.93
t2	59.32	64.21

Tablo 2: Laktat değerleri

	Grup 1	Grup 2
t0	32.31	30.84
t1	43.23	41.96
t2	41.11	38.49

değerlendirdiğimizde, t1 zamanındaki laktat değerleri Grup 2'de Grup 1'e göre daha düşük bulunmasına karşın istatistiksel anlam taşımıyordu. t2 zamanındaki laktat değerlerinde ise Grup 2'de Grup 1'e göre anlamlı düşüş gözlemlendi ($p < 0.05$). KK değerlerinde de diğer parametrelerde olduğu gibi her iki

grupta (Tablo 3), t1 ve t2 zamanlarında t0'a göre artış görülmüştür ($p < 0.05$). Ancak KK değerlerinde t1 ve t2 zamanlarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tartışma

Tablo 3: Kreatin kinaz değerleri

	Grup 1	Grup 2
t0	419.84	481.55
t1	1356.91	1416.61
t2	2812.29	1623.34

İskelet kasında oluşan akut iskemi sonrasında ekstremitelere yeniden kan akımı sağlanması, serbest oksijen radikalleri gibi reperfüzyon ürünlerinin oluşmasına neden olur. Ekstremitelerde oluşan akut iskemi ve reperfüzyon, kompleks bir inflamatuvar döngünün başlamasına ve bunun sonucunda da hem ekstremitenin kendisinde, hem de bazı hedef dokularda hasara neden olmaktadır [9,10].

SA serum ve dokularda bulunan glikolipid ve glikoproteinlerin terminal oligosakkarit zincirlerinin önemli bir komponentidir [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SA ile kardiyovasküler hastalıklar arasında yakın bir ilişki tespit edilmiştir [11-13]. Bunun yanında akut inflamatuvar hastalıklar veya hasar sonucunda ortaya çıkan birçok akut faz reaktanı ile serum SA değerleri arasında bir korelasyonun olduğu görülmüştür [14,15].

SA hücre membranlarında taşıdığı negatif yük nedeni ile membran gerginliğinin sağlanmasında rol oynar. Eritrosit membranlarındaki bu negatif yükün hemoreolojikal ve hemodinamik önemi vardır [3,16]. Bazı proteinlerin siyalizasyonu sırasında platet agregasyonu, fibrinojenin pıhtılaşmaya yol açması, kapiller permeabilitede geçirgenliğin artması, damar duvarında lipoproteinlerin tutulması ve in vivo eritrosit agregasyonu gibi patolojiler olabilmektedir [3,4,16,17].

İskemi sırasında hücrenin membran bütünlüğü korunamamakta ve kalsiyum, fosfolipid A2, yağ asidi radikalleri, laktat gibi ürünlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda her iki grupta da iskemi safhasını gösteren t1 zamanındaki değerler incelendiğinde SA, laktat ve KK değerlerinde t0 sürelerine göre anlamlı değişiklikler gözlenmektedir ($p < 0.05$). SA değerlerinin iskemi sırasında yükselmesi beklenen KK ve laktat değerleri ile birlikte yüksek bulunması, serum total SA'nın iskemiye bir yanıtı olarak değerlendirilebilir.

Yaptığımız çalışmada hem kontrol, hem de çalışma gruplarındaki t2 süreleri ile ilgili değerler 1 saat süre ile uygulanan reperfüzyon sonucunda elde edilmiştir. Reperfüzyon sırasındaki total SA her iki grupta da yüksek bulunmuştur. Bu değerler iskemi sırasındaki değerlerle karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0.05$). Bundan da total SA'nın reperfüzyona olan duyarlılığının iskemiye göre daha fazla olduğu sonucu çıkmaktadır. Reperfüzyon sırasında oksijen metabolitlerinin etkileri, membran lipitlerinin fonksiyon ve morfolojilerinde bozulmaya neden olmaktadır. Total SA değerlerindeki yüksekliğin bu patoloji ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Laktat, iskemiye gösteren bir marker olmasına rağmen dokunun yeniden kanlanması ile birlikte düşmeye başlamaktadır ve reperfüzyon sırasındaki hücresel değişiklikleri saptamakta yeterli olmamaktadır. Bizim çalışmamızda da reperfüzyon sırasındaki laktat değerlerinde düşüş görülmekle birlikte bu düşüş anlamlı değildi. Serum total KK değerlerinin iskemi sırasında yükseldiği, reperfüzyonla birlikte bu yüksekliğin

devam ettiği bilinmektedir. Bu yükselme çizgili kaslarda oluşan hücresel hasarın direkt yansımasıdır. Bizim çalışmamızda da her iki grupta da reperfüzyon sırasında KK artışı devam etmiştir.

Bir metilksantin derivesi olan pentoksifilin eritrosit akıcılığını ve dolayısı ile besleyici kan akımını artırmakta, platelet agregasyonunu azaltmakta, yükselmiş fibrinojen seviyelerini ve viskoziteyi azaltmakta, fibrinolitik aktiviteyi artırmakta ve kanın antifibrinolitik kapasitesini azaltmaktadır [18-20]. Pentoksifilin, bu hemoreolojik ve hemostatik etkisi ile iskemi ve reperfüzyon sonucunda ortaya çıkan patolojik değişiklikler üzerinde olumlu yönde etki etmektedir. Ayrıca damar duvarından prostasiklin sentez ve salınımı ile birlikte platelet cAMP seviyelerini artırmakta ve böylece artmış olan platelet cAMP agregatör tromboxan A2 sentezini önlemektedir [21,22].

Çalışma grubuna pentoksifilin vererek diğer grupla olan farkları gözlemlemeye çalıştık. Bunu yapmaktaki amacımız, pentoksifilin sahip olduğu etkileri nedeni ile SA değerleri üzerinde bir etki gösterip göstermediğini araştırmaktır. Her iki grubu kıyasladığımız zaman, t0 sürelerinde parametrelerin hiçbirisinde bir değişim görülmemiştir. Her üç parametrenin t2 sürelerindeki değerleri ile ilgili değerlendirmede farklılıklar göze çarpmıştır. KK değerlerinde Grup 2'deki değerler Grup 1'e göre daha az yüksek olarak bulunmuştur. Bu değerler KK düzeylerinin pentoksifilin verilmesine karşın azalmadığı ve bir yanıt vermediğini göstermektedir. Laktat değerleri kıyaslandığında Grup 2'deki değerlerin Grup 1'e göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni verilen ilacın doku oksijenasyonunu artırması ve antiiskemik etkilerinin rol oynamasıdır. Yine aynı şekilde t1 zamanında, Grup 2'de total SA değerlerinin Grup 1'e göre anlamlı derecede düşük bulunması pentoksifilin etkilerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Reperfüzyonu gösteren t2 zamanında KK değerlerindeki artış Grup 1'de Grup 2'ye göre çok daha fazla olmuştur. Her iki grubu t2 süresinde kıyasladığımızda Grup 2'ye göre Grup 1'deki KK değerlerinin belirgin yüksekliği göze çarpmaktadır ($p < 0.05$). Reperfüzyon sırasında düşmeye başlayan laktat değerlerindeki azalma Grup 2'de daha belirgindi ve Grup 1 ile kıyaslandığında anlamlıydı ($p < 0.05$). Reperfüzyon sonucunda belirgin şekilde artmış olan total SA değerleri, Grup 2'de Grup 1'e göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p < 0.05$). Bu değişiklikler verilen ilacın etkisinin reperfüzyon sırasında da devam ettiğini göstermektedir.

İnsanlarda SA'nın büyük bir bölümü fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının yapısında yer alır. Plazma SA düzeyinin fibrinojen düzeyine bağlı olarak değiştiği ileri sürülmüştür. Membranlardaki SA hareketlerinin oluşturduğu elektrostatik değişiklikler eritrosit agregasyonuna ve rulo formasyonuna, ayrıca kan viskozitesinde değişikliklere de yol açabilmektedir. Tüm bu değişiklikler göstermiştir ki, vasküler endoteliumda meydana gelen eritrosit aktiviteledeki değişiklikler ile SA seviyeleri arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda SA'nın birleşimindeki yapıların bazı hemorolojik faktörle, transvasküler permeabiliteyle ve damar duvarındaki lipid birikimi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir.

Hem iskemi, hem de revaskülarizasyon sırasında total SA değerlerinin kontrol grubunu gösteren Grup 1'e göre, pentoksifilin verilen Grup 2'de daha düşük bulunması, pentoksifilin fibrinojen ve fibrinolitik aktivitede, eritrositler üzerinde ve damar duvarında yaptığı etkilerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Son yıllarda birçok hastalığın mekanizmasında ve iskemide de rol oynadığı görülen SA ile ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği kanısını taşımaktayız.

Kaynaklar

1. Ng S, Dain JA, Rosenberg A, Schengrund S. The natural occurrence of sialic acids. In biological role of sialic acid. Plenum 1976;5:90-102.
2. Gavella M, Lipovac V. Erythrocyte sialic acid alterations in experimental diabetes. Cellular and Molecular Biology 1985;31:75-80.
3. Rogers ME, Williams DT, Nithyayanathan R, et al. Decrease in erythrocyte glycoprotein sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes. Clin Sci 1992;82:309-13.
4. Castello M, Barry A, Fiedel BA, Gewurz H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialysed alpha-1 acid glycoprotein. Nature 1979;281:677-8.
5. Watts GF, Crook MA, Haq S, Mandala S. Serum sialic acid as a indicator of change in coronar disease. Metabolism 1995;44:147-8.
6. Crook JR, Goldman JH, Dalziel M, Madden B, Mc Kenna WJ. Increased ventricular sialylation in-patients with heart failure secondary to ischemic heart disease. Clin-Cardiol 1997;20:455-8.
7. Konukoğlu D, Çelik Ç, Akçay T, Hatemi H, İpbüker A. NIDDM'li olgularda serum total sialik asit ve lipid bağlı sialik asit düzeylerinin önemi. Klinik Gelişim 1995;8: 3507-10.
8. Yoyama H, Jensen JS, Myrup B, Mathiesen E, Ronn B, Deckert T. Raised serum sialic acid concentration precedes onset of microalbuminuria in IDDM. Diabetes Care 1996;19:335-40.
9. Sağdıç K, Ener S, Gür E, ve ark. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. Damar Cer Derg 1996;2:51-7.
10. Gaines GC, Welborn B, Moldawer L, et al. Attenuation of skeletal muscle ischemia / reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. J Vasc Surg 1999;29:370-6.
11. Sönmez H, Öztürk ZG, Ulutin T, Domaniç N, Kökoğlu E. Carbohydrate-deficient transferrin and sialidase levels in coronary heart disease. Thromb Res 2000;99:311-5.
12. Allain P, Olivier E, Le Bouil A, Benoit C, Geslin P, Tadei A. Increase of sialic acid concentration in the plasma of patients with coronary disease. Press Med.1996;25:96-8.
13. Şencan M, Topçu S, Dökmetaş HS, İçağaslıoğlu S, İbiş M, Duman İ. Serum sialik asit düzeylerinin diabetin komplikasyonları ile ilişkisi. Türkiye Tıp Dergisi 1999;6:81-5.
14. Crook M, Haq M, Haq S, Tutt P. Plasma sialic acid and acute-phase proteins in patients with myocardial infarction. Angiology 1994;45:709-15.
15. Haq M, Haq S, Tutt P, M Crook. Serum total sialic acid and lipid-associated sialic acid in normal individuals and patients with myocardial infarction, and their relationship to acute phase proteins. Ann Clin Biochem 1993;30:383-6.
16. Raz I, Havivi Y, Yarom R. Reduced negative surface charge on arterial endothelium of diabetic rats. Diabetologia 1988;31:618-20.
17. Chandrasekhar N, Warren L, Osbahr AJ, Laki K. Role of sialic acid in fibrinogen. Biochim Biophys Acta 1962;63: 337-9.
18. Schweiger H, Ortmeier J. Treatment of chronic occlusive arterial disease with pentoxifylline: Changes in clinical and haemodynamic parameters. Pharmatherapeutica 1989;5: 289-304.
19. Currie MS, Simel DL, Christenson RH, et al. Anti-inflammatory effects of pentoxifylline in claudica

- tion. Am J Med Sci 1991;301:85-90.
20. Kishi M, Tanaka H, Seiyama A, et al. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in skeletal muscle after partial ischemia. Am J Physiol 1998;274:435-42.
 21. Poggesi L, Scarti L, Boddi M, Masotti G, Sernerri GG. Pentoxifylline treatment in patients with occlusive peripheral arterial disease. Circulatory changes and effects on prostaglandin synthesis. Angiology 1985;36:628-37.
 22. Coe DA, Freischlag JA, Johnson D, et al. Pentoxifylline prevents endothelial damage due to ischemia and reperfusion injury. J Surg Res 1997;67:21-5.