

DENEYSEL ÇALIŞMALAR:

**TAVŞANLARDA HİPERGLİSEMİNİN SEREBRAL
İNFARKT VOLÜMLERİ,
SERUM LAKTİK DEHİDROGENAZ VE
KREATİN KİNAZ DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Osman ACAR*, Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ**, Dr. S. Serpil KALKAN***,
DR. Erdal KALKAN ****, Dr. Gülden GEDİKOĞLU *****

ÖZET

24 tavşanın kullanıldığı bu çalışmada, tavşanların yarısında dekstroz verdikten sonra diğer yarısında ise dekstroz vermeden embolik bir serebral iskemi yaratılmıştır. Embolizasyondan 24 saat sonra öldürülen tavşanlarda; serebral nekroz volümleri hesaplanmış, ayrıca aralıklı alınan kan örnekleri ile serum CK ve LDH düzeyleri değişimleri araştırılmıştır. Sonuçlar literatür ışığında tartışılmıştır.

SUMMARY

Effects of hyperglycemia on the cerebral infarct volume and serum LDH, CK levels in the rabbits.

In this study, where 24 rabbits were used, an embolic cerebral ischemia was developed after dextrose giving in half of the rabbits and without dextrose giving in the other half. At the rabbits, which were killed 24 hours after embolisation, volumes of cerebral infarct were determined; also the changes in serum CK and LDH levels were investigated. The results were discussed and literature was reviewed.

GİRİŞ

Serebral iskemide beyin glikoz konsantrasyonunun iskemik beyin lezyonunun şiddetini etkileyen faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Siemkowiez ve Hansen (1) ratlarda boyun damarlarına 10 dakikalık bir kompresyon uygulayarak total beyin iskemisi yarattıklarını ve iskemi anında normoglisemik olan ratların hafif nörolojik defisitlerle yaşadıklarını; hiperglisemik olanların ise komaya girerek 24 saat içerisinde öldüklerini gözlemişlerdir. Myers ve arkadaşları (2) ise aç bırakılan maymunların 14 dakikalık kardiyak arresti sadece minimal düzeydeki nörolojik defisitler ve sınırlı nöropatolojik anomaliler ile tolere ettiklerini halbuki arrestten önce glikoz verilen hayvanlarda ise ileri nörolojik defisitlerin ve yaygın gri madde nekrozunun görüldüğünü belirtmişlerdir. Kahmo ve arkadaşları da (3) bu sonuçları destekleyen bulgular yayınlamışlardır. Buna karşın serebral iskemi öncesi verilen dekstrozun iskemik beyin tahribini azalttığını bildiren araştırmalar da vardır (4,5).

Serum enzimlerinin özellikle CK (kreatin kinaz) ve LDH (Laktik dehidrogenaz)'ın serebrovasküler olayın şiddeti ile belirgin ilişki gösterdiği bilinmektedir (6). Kreatin kinaz ATP aracılığı ile kreatinin reversibl forforilasyonunu katalize eden bir enzimdir. Bu

* S.Ü.T.F. Nöroşirürji ABD. Öğretim Üyesi, Yard. Doç. Dr.

** S.Ü.T.F. Biyokimya ABD. Öğretim Üyesi, Yard. Doç. Dr.

*** S.Ü.T.F. Morfoloji ABD. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi, Dr.

**** S.Ü.T.F. Nöroşirürji ABD Araş. gör.

***** S.Ü.T.F. Fizyoloji ABD Araş. gör.

enzim iskelet adalesi, beyin ve kalp dokularında yüksek konsantrasyonda bulunur. LDH ise hidrojen transfer eden bir enzimdir. LDH laktatın piruvata oksidasyonunu NAD (Nikotinamid adenin nükleotit) aracılığı ile katalize eder. Vücudun hemen hemen tüm hücrelerinde bulunur (7).

Bu çalışmada tavşanda homolog kan embolisinin kullanıldığı serebral iskemi modelinde embolizasyon öncesi verilen dekstrozun serebral infarkt volümü ve serum CK, LDH düzeyi üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYEL ve METOD

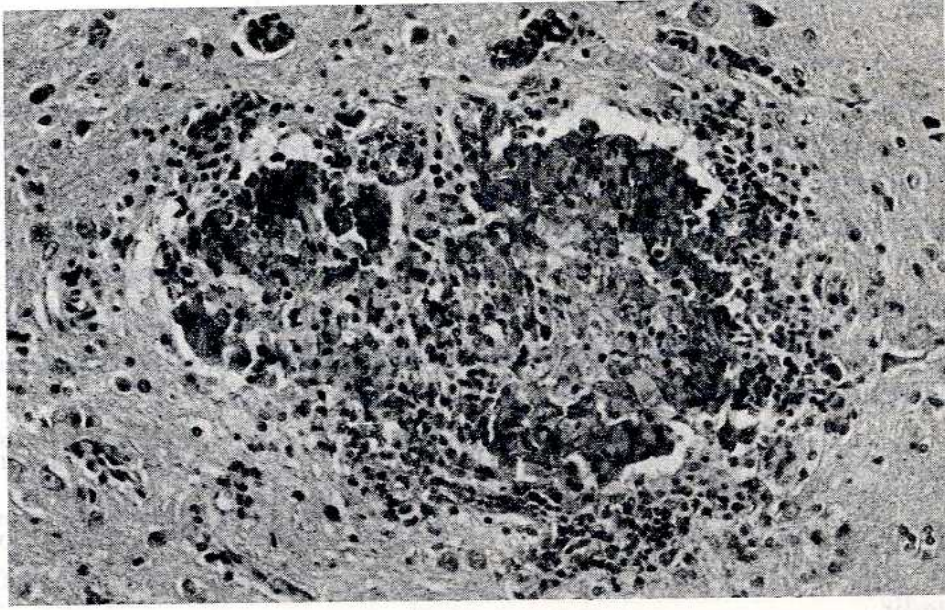
Çalışmamızda 2-3 kg ağırlığında 24 adet NZW tavşanı kullanıldı. Tüm tavşanlardan üç saatlik açlık süresi sonunda serum CK, LDH, kan glikoz düzeyi tayini ve embolizan madde olarak kullanacağımız pıhtıyı hazırlamak için 3.5 cc kan alındı. 24 saatlik bir aradan sonra 2 gruba ayrılan tavşanlar tekrar üç saat aç bırakıldı. Üç saatlik sürenin sonunda tavşanlar 1 gr/kg üretan verilerek uyutuldu. Anestezi sonrası I. gruptaki tavşanlara I.P olarak %50'lik dekstroz solüsyonu (3 gr/kg) verildi. II. gruptaki tavşanlara ise dekstroz solüsyonu ile aynı hacimde steril bidistile su I.P olarak verildi. Daha sonra hazırlanan homolog kan pıhtısı common karotis arter içinde enjekte edildi (8). Embolizasyon işleminin sonunda tüm tavşanların kulak veninden kan glikoz düzeyini tayini için 0.5 cc kan alındı. İşlem sonrası 24 saat gözlenen tavşanlara hidrasyonu sağlamak için 12 saatte bir 15 ml steril su I.P. verildi. 24 saatin sonunda CK ve LDH tayini için 1'er cc kan alınan tavşanlar %4'lük formaldehid solüsyonunun intrakardiyak verilmesi ile öldürüldü. Ölümden hemen sonra tavşanların beyinleri çıkartıldı ve çıkartılan beyinler %20'lik formaldehit solüsyonu içerisinde bir hafta bekletildi. Bu sürenin sonunda tüm beyinden 5 mikron kalınlığında koronal seri kesitler alındı, H.E. ile boyandı ve infarkt alanları ışık mikroskopunda oküler mikrometresi aracılığı ile hesaplandı. Alan hesabı sonunda $V = a \cdot d / L$ formülü (V =İnfarkt hacmi, A = Nekroz alanı, d = kesit kalınlığı, L = Objektif büyütmesi) kullanılarak infarkt hacimleri hesaplandı (9).

Enzim analizleri ise kan örnekleri alınır alınmaz hemen çalışıldı. Kreatin Kinaz analizi Oliver modifiye yöntemi ile çalışılarak U/L olarak, LDH Cabaud-Wroblewski yöntemi ile çalışılarak U/L olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Emboli verildikten sonra alınan kan örneklerinde glikoz verilmeyen grupta kan glikoz değerinin ortalaması 118.08 ± 21.67 mg/dl olarak bulundu. Bu değer glikoz verilenlerde 327.25 ± 38.06 mg/dl idi.

Histopatolojik Bulgular: Alınan kesitlerin mikroskopisinde normoglisemik ve hiperglisemik tavşanlarda infarkt alanlarının multipl olduğu ve infarkt alanlarındaki nöronların çekirdeklerinde piknoz ve erime olduğu, stoplazmaların eosinofilik boyandığı, parankim nekrozu ile mikroglia proliferasyonunun geliştiği görülmüştür. Damarların lümenlerindeki eritrositlerin sınırlarının bozulduğu, fibrin oluşumu ile trombus yapısının geliştiği saptanmıştır (Resim I). İşlem öncesi glikoz verilen tavşanlarda infarkt hacminin ortalama 16.425 ± 0.56 mm³ olduğu ve bu değer glikoz verilmeyen grubun ortalama infarkt hacmi olan 8.696 ± 0.32 mm³'den istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$).



RESİM-1

İnfarkt alanlarının mikroskopik görünümü, HE, (4 x)

Enzim Çalışmaları: Normoglisemik grubun emboli öncesi CK düzeyi ortalama 393.08 ± 105.24 U/L, emboli sonrası ise ortalama 572.81 ± 161.28 U/L idi. Bu değerler LDH için sırası ile 250.16 ± 58.47 U/L ve 441.817 ± 153.08 U/L olarak ölçüldü. Bu farklar, istatistiksel olarak hem CK için ($p < 0.005$), hemde LDH için ($p < 0.001$) önemli bulundu.

Hiperglisemik grupta ise emboli öncesi ortalama 407.16 ± 10.6 U/L olan CK düzeyi emboli sonrası ortalama 578.72 ± 104.50 U/L olarak saptanmıştır. Bu değerler LDH için sırası ile 242.66 ± 61.51 U/L ve 431.90 ± 155.70 U/L idi. Bu farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (CK için $p < 0.005$, LDH için $p < 0.001$).

Ayrıca emboli öncesi normoglisemik grubun CK ve LDH düzeyleri, hiperglisemik grubun emboli öncesi CK ve LDH düzeyleri ile herbir enzim için kendi aralarında karşılaştırılmış ve aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Emboli sonrası normoglisemik ve hiperglisemik grubun CK ve LDH düzeyleri için aynı şekilde yapılan istatistiksel karşılaştırmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda hiperglisemik tavşanlardaki serebral infarkt hacimlerinin normoglisemik tavşanlardaki serebral infarkt hacimlerinden fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar Myers ve arkadaşlarının bildirdikleri sonuçlarla uyumludur.

Hipergliseminin iskemik beyin tahribini nasıl artırdığı kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte hipergliseminin kan osmoralitesini artırarak, serebral kan akımını ileri derecede bozarak veya iskemik beyinde aşırı laktik asit üretimine yol açarak etki ettiği düşünülmektedir (10,11).

Ginsberg ve arkadaşları (12) ratlardaki serebral kan akımı ölçüm çalışmalarında ölçüm öncesi glikoz verdikleri ratlarda serebral kan akımının vermediklerine göre %30 oranında

az olduğunu saptamışlar ve bunu artmış beyin glikoz konsantrasyonunun neden olduğu beyin gravitesindeki azalmaya bağlamışlardır. Ayrıca araştırmacılar serebral kan akımındaki bu azalmayı hipergliseminin iskemik beyin tahribini artırıcı nedeni olarak görmediklerini bildirmişlerdir.

Pulsinelli ve arkadaşları (10) ise serebral iske mi yarattıkları ratların, hiperglisemik olanlarında serebral kan akımının normoglisemik olanların serebral kan akımına göre eş veya daha fazla olduğunu bildirmiş ve hiperglisemiklerde iskemik beyin tahribinin artım nedeninin reperfüzyon başarısızlığından değil, aşırı laktik asit birikiminden kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Başka araştırmacılar da hiperglisemik hayvanların iskemik beyinlerinde laktik asit birikiminin normoglisemiklerin iskemik beyinlerinden fazla olduğunu göstermişlerdir (11, 13). Ayrıca hiperglisemik ratların iskemik beyinlerinde ekstrasellüler (H^+) konsantrasyonunun normoglisemiklerin iskemik beyinlerinden daha fazla olduğunda saptanmıştır (14).

Ağır bir iske mi esnasında beyin karbonhidratlarının hemen hemen tamamının oksijen yetersizliği nedeni ile laktik aside dönüştüğü bilinmektedir (15). İnkomplet bir iskemide ise daha çok laktat miktarı artmaktadır (16). Laktat yükselmesinin nedeni olarak kısmen devam eden glikoz dağıtımının laktata anaerobik dönüşüm için substrate sağlaması gösterilmektedir.

Welsh ve arkadaşları da (11) serebral iske mi öncesi glikoz verilen ratlarda verilmeyenlere göre beyin laktat miktarında %30'luk bir fazlalık saptamışlardır. Bu laktat fazlalığının iske mi sonrası serebral kan akımında ve metabolit seviyelerinde düzelmeyi etkileyen önemli faktörlerden olduğunu kabul etmişlerdir. Ancak laktat fazlalığını hiperglisemiklerde iskemik beyin tahribini artıran temel neden olarak görmediklerini bildirmişler ve heterojen laktat dağılımına dikkat çekmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu yaptıkları çalışmalarda bir grup rata glikoz verdikten sonra, diğer bir grup rata ise glikoz vermeden 15 ve 30 dakikalık serebral iskemiler yaratmışlardır. Glikoz verdikleri ratlarda 15 dakikalık iske mi sonrası serebral perfüzyonda, buna paralel olarak da azalan ATP, fosfokreatinin ve artan laktat seviyelerinde heterojen bir dağılım gözlemişlerdir. Ayrıca serebral perfüzyonda, enerji metabolitlerinde ve laktat miktarlarındaki bu heterojenliği iske mi öncesi glikoz almayan ratlarda ancak 30 dakikalık bir iskemiyi takiben gördüklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu gözlemlerine dayanarak hiperglisemik ratlarla normoglisemikler arasında iske mi olayı anında önemli bir fark olmadığını, temel farkın resirkülasyon esnasında ortaya çıkan hemodinamik ve metabolik iyileşme başarısızlıklarına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (11, 12).

Hastalıkların seyri esnasında serum enzimlerinin değişebileceği bilinen bir gerçektir (17). Serebrovasküler hastalıkların serebrospinal sıvı ve serum enzim düzeyleri üzerine etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (6, 17, 18).

Serum CK ve LDH enzim artışının mekanizması tam olarak ortaya konulamamasına rağmen iske mi nedeni ile nekroz gelişen dokudan kana sızdığı düşünülebilir. Akut beyin hasarında serum CK düzeylerinin artabileceği Eisen ve Wolintz (17, 18) tarafından bildirilmiştir.

Bizim bulgularımızda emboli sonrası gelişen iske mi nedeni ile emboli sonrasında ölçülen enzim düzeylerinin belirgin bir artış gösterdiği dir. Fakat infarkt sahasının büyüklüğü ile enzim düzeyi arasında belirgin bir korelasyon saptanamamıştır.

Nedeni tartışmalı olmakla birlikte hipergliseminin iskemik beyin tahribini artırdığı na

yaygın olarak inanılmaktadır (1, 2, 9, 10, 11, 12, 14). Bizim araştırmamızın sonuçları da bu inancı desteklemektedir. Fakat bu araştırmaların tümünde deneklere oldukça fazla miktarda glikoz yüklemeleri yapılmıştır. Klinik tedavi yöntemlerine daha fazla katkısı olabilmesi için araştırmaların daha az miktardaki glikoz yüklemeleri ile de yapılması gerekliliğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Siemkiewicz, E., Hansen, A.J.: Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-normo-and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand.* 58:1-8, 1978.
2. Myers, R.E., Yamaguchi, S.: Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys. Preservation of vision. *Arch Neurol.* 34: 64-74, 1977.
3. Kahmo, H., Rehncrona, S., Soderfeldt, B., Olsson, Y., Siesjo, B.K.: Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: J.Histopathology. *J.Cereb. Blood. Flow Metab.* 1: 313-327, 1981.
4. Ginsberg, M.D., Prado, R., Dietrich, W.D., Busto, R., Watson, B.D.: Hyperglycemia reduces the extent of cerebral infarction in rats. *Stroke.* 18:3,570-574, 1987.
5. Jurnigan, J., Nashville, T.N., Evans, O.B., Jackson, M.S., Kirshner, H.S.: Hyperglycemia and diabetes improve outcome in a rat model of anoxia/ischemia. *Neurology.* 34(suppl 1): 262, 1984.
6. Lamers, K.J.B., Schoonderwaldt, H.C., Burkent, M.V., Theenwess, B.G.M., Doesburg, W.H., Newers, R.A.: The effects of acute cerebrovascular disease on serum and cerebrospinal fluid parameters. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 89-1: 23-29, 1987.
7. Aras, K., Ersen, G.: Teorik ve Klinik Enzimoloji: Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 149-164, 1988.
8. Acar, O., Kalkan, S.S., Kalkan, E., Pekel, H., Durak, A.C.: Tavşanlarda Homolog Kan Embolisi Kullanılarak Oluşturulan Bir Serebral İskemi Modeli, S.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi (Baskıda).
9. Nedergaard, M.: Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Research.* 408:79-85, 1987.
10. Pulsinelli, A.W., Waldman, S.B.S., Rowlinson, D., Plum, Fred.: Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage.: A neuropathologic study in the rat. *Neurology,* 32: 1239-46, 1982.
11. Welsh, F.A., Ginsberg, N.D., Rieder, W., Budd, W.W.: Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat: Regional Metabolite Levels. *Stroke.* II: 355-363, 1980.
12. Ginsberg, M.D., Welsh, F.A., Budd, W.W.: Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. J.Local cerebral blood flow and glucose utilization. *Stroke.* II: 347-354, 1980.
13. Rehncrona, S., Roson, J., Siesjo, B.K.: Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: J. Biochemistry and Neurophysiology. *J. Cereb. Blood Flow Metab* I: 297-311, 1981.
14. Siemkiewicz, E., Hansen, A.: Brain extracellular ion composition and EEG activity following 10 minutes ischemic in normo and hyperglycemic rats. *Stroke.* 12:236-240, 1981.
15. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., Schulz, D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J.Biol. Chem.* 239: 18-30, 1964.
16. Nordström, C.H., Rehncrona, S., Siesjö, B.K.: Restitution of cerebral energy state after complete and incomplete ischemia of 30 min duration. *Acta Physiol Scand* 97:270-272, 1976.
17. Eisen, A.A.: Serum creatine phosphokinase activity in cerebral infarction. *Neurology.* 18: 263-268, 1968.
18. Wolintz, A.H.: Serum and cerebrospinal fluid enzymes in cerebrovascular disease: Creatine phosphokinase, Aldolase and lactate dehydrogenase. *Arch. Neuro* 20:54-61, 1969.