

# ERKEN DÖNEM DENEYSEL STROKDA SİTOKİNLER

Dr. Fatih ÖZDAĞ (\*), Dr. Semai BEK (\*), Dr. Ümit Hıdır ULAŞ (\*),  
Dr. Erdal EROĞLU (\*), Dr. Zeki GÖKÇİL (\*), Dr. Şeref DEMİRKAYA (\*),  
Dr. Ali ŞENGÜL (\*\*), Dr. Okay VURAL (\*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (2) : 114 - 116 (2003)

## ÖZET

*Strok endüstriyel ülkelerde ölüm ve sakatlığa yol açan hastalıkların önde gelenlerinden birisidir. Santral sinir sistemindeki iskemik hasarın artmasında enflamatuvar cevap önemli yer tutar. Sitokinler enflamatuvar cevabı yönlendiren mediatörlerdir. Bu çalışmada deneysel strok oluşturulan farelerle (n=12) sham operasyonu uygulanan farelerin (n=9) iki major sitokin düzeyleri, serum interleükin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör - alfa (TNF-alfa) saptandı. Stroklu farelerin serum IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri sham grubuna göre anlamlı düzeyde artmış bulundu (p=0.000).*

**Anahtar Kelimeler:** TNF-alfa, IL-6, Strok.

## ABSTRACT

### **Cytokines In Early Experimental Stroke**

*Stroke is one of the leading causes of death and disability in major industrial countries. The inflammatory response plays an important role in the potentiation of central nervous system (CNS) ischemic injury. Inflammatory response is mediated by cytokines. In this study we investigated two of the cytokines: interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor - alpha (TNF-alpha) in an experimentally induced stroke (n=12) mice group and sham (n=9) mice group. Stroke caused significant increases both on the levels of IL-6 and TNF-alpha in the stroke group (p=0.000).*

**Key Words:** TNF-alpha, IL-6, Stroke.

## GİRİŞ

Strok pek çok toplumda başta gelen halk sağlığı problemlerinden birisidir. Beynin bir bölümünü besleyen arterlerin tıkanması sonucu strok oluşur. Strokda nörolojik defisiti yada kalıcı sakatlığı belirleyen etken yalnızca primer serebral infarktın çapı ve yerleşimi değildir. Enflamasyon ve vazojenik beyin ödeminin neden olduğu ikincil beyin hasarı da morbiditenin artmasında önemli yer tutar. Santral sinir sistemi hasarında enflamatuvar yanıt hasarı potansiyelize eder (1).

Serebral iskemi sonrası oluşan enflamatuvar hasarın patogeneğinde lökositlerin rolü ve hasarı artırma mekanizmaları bilinmektedir (2). Sitokinler enflamatuvar cevabı yönlendirerek bu patofizyolojik mekanizmalar içinde yer alırlar (3). Birer sitokin olan IL-1 $\beta$ , TNF-alfa ve IL-6'nın lökositleri aktive edici ve astrositler, endotel hücreleri ve lökositler üzerindeki adezyon reseptörlerini artırıcı etkileri gösterilmiştir (4).

GATA Nöroloji Kliniği Beyin Araştırmaları Laboratuvarında yapılan bu çalışmada deneysel strok oluşturulan farelerde ortaya çıkan serebral iskemi ve infarktın birer sitokin olan TNF-alfa ve IL-6'nın serum düzeylerini nasıl etkilediği incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada GATA Araştırma Merkezinden temin edilen 28-35 g ağırlığında 21 adet erkek Bulb-C cinsi fare kullanıldı. Hayvanlar 2 gruba ayrıldı. 1) Strok grubu, (n=12) ve 2) Sham grubu (n=9). Fokal serebral infarkt oluşturmak için intraluminal naylon filament sütür (6/0) modeli kullanıldı (5) ve sağ orta serebral arter kalıcı olarak tıkanıldı. Sham grubuna sağ karotis arter disseksiyonu yapıldı ve 6/0 ipek kullanılarak karotis bifurkasyonu proksimalinden bağlandı. Anestezi için intraperitoneal Ketamin (Alfamine®, EGE VET) (100 mg/kg) ve Xylazine (Alfazyne®, EGE VET) (10 mg/kg) karışımı uygulandı. Cerrahi işlem süresince hayvanların vücut sıcaklığı ısı kontrollü bir ısıtma masası kullanılarak 36.5 $\pm$ 0.5 °C düzeyinde tutuldu.

Cerrahiden 24 saat sonra hayvanlara derin anestezi uygulandı; intrakardiyak 1 ml kan örneği ali-

(\*) GATA Nöroloji AD.

(\*\*) GATA İmmünoloji AD.

Reprint Request: Dr. Fatih ÖZDAĞ, GATA Nöroloji Anabilim Dalı, 06018, Etilik/ANKARA

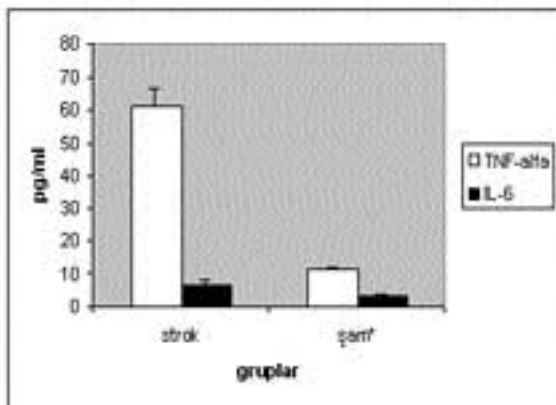
Kabul Tarihi: 30.04.2003

arak dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı. Elde edilen beyinler, herhangi bir tespit edici solüsyon kullanılmadan hemen koronal planda 2 mm lik kalınlıkta kesildi. Her bir kesit 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) kullanılarak boyandı (6). İnfarktlı bölgelerin hacimleri bir görüntü analiz programı kullanılarak (Osiris, Digital Imaging Unit, University Hospital of Geneva, Switzerland) beş kesit üzerinden hesaplandı. Hacim hesaplarında ödem etkisini ortadan kaldırmak için indirek yöntem kullanıldı; ipsilateral hemisferdeki infarkt olmayan alan, konturlateral intakt hemisferden çıkarıldı (7); kalan infarktlı alanlar toplanarak kesit kalınlıkları ile çarpıldı ve tüm beyine göre infarkt hacmi yüzde olarak hesaplandı.

Alınan kan örneği 5000 devirde 2 dakika santrifüj edildi; elde edilen plazma TNF-alfa ve IL-6 seviyelerinin tespiti için -70 °C de saklandı. IL-6 ve TNF-alfa seviyeleri bu örneklerden enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Cytelisa; Cytimmune Science Inc; Maryland, USA) yöntemi ile çalışıldı. IL-6 ve TNF-alfa seviyeleri istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

## SONUÇLAR

Stroklı grupta IL-6 seviyeleri  $11.19 \pm 2.33$  pg/ml iken; Sham grubunda bu değer  $3.34 \pm 0.16$  pg/ml bulundu. TNF-alfa düzeyleri stroklı grupta  $60.73 \pm 8.52$  pg/ml; Sham grubunda ise  $6.24 \pm 1.07$  pg/ml saptandı. Mann-Whitney U testi strok grubu ile Sham grubunun IL-6 ( $p=0.000$ ) seviyeleri ile TNF-alfa ( $p=0.000$ ) seviyeleri arasında istatistiksel anlamlılığı gösterdi (Şekil I). Strok grubunda tüm hayvanların beyinlerinde infarkt alanları gösterildi. İnfarkt hacmi %  $23.11 \pm 2.00$  olarak bulundu.



Şekil-1: Grupların IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri (standart sapma barları ile). (\*) Sham grubunun verileri strok grubundan anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0.000$ ).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan iskemi ve strok ile birer sitokin olan TNF-alfa ve IL-6 nın plazma konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir.

Akut iskemik strokta lökositlerin iskemik dokuya birikimi iyi koordine edilmiş dinamik bir olaydır. Lökosit - endotel hücre adezyon kaskadı adezyon molekülleri ve kemoatraktan maddelerle yönlendirilir: 1) Selektinler, 2) Kemoatraktanlar, 3) Integrinler ve 4) İmmünoglobulinler . Bu kaskaddaki ilk olay selektinlerle başlatılır ve sonrasında sitokinler gibi kemoatraktan moleküller devreye girer (8). Sitokinler hücreler arası ilişkilerin sağlanmasında önemi olan küçük polipeptid proteinlerdir (2). Sitokin ailesinin molekül ağırlıkları 8 ila 468 kilodalton arasında değişen IL-6 ve TNF-alfa'nında içinde bulunduğu 30 kadar üyesi vardır (9). Santral sinir sisteminde nöronlar ve glial hücreler tarafından salgılanan (2) TNF-alfa'nın nöronal ekspresyonu doku hasarını daha fazla artıracak olan enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu hızlandırır (10). IL-6 ise astrositler için mitojeniktir ve TNF ile birlikte proliferatif etki gösterir (11). Özellikle hepatositlere etki ederek C reaktif protein ve fibrinojen sentezini artırmak suretiyle akut faz reaksiyonunu regüle eder (2).

Bizim çalışmamızda ortaya konulan strok sonrası TNF-alfa ve IL-6 plazma düzeylerindeki anlamlı artış bu konuda yapılmış diğer çalışmalarla uyumludur. Kouwenhoven; TNF-alfa, IL-12 ve IL-6 salgılayan monosit ve mononükleer hücrelerin strokun erken fazında arttığını göstermiştir (12). Liu; ratlarda kalıcı orta serebral arter tıkanmasıyla deneysel strok oluşturularak iskemik ve noniskemik kortekste TNF-alfa mRNA ve protein ekspresyonunu araştırmış ve 12 saatte TNF-alfa mRNA ekspresyonunun pik yaptığını bulmuştur (10). 19 farklı sitokine ait mRNA düzeyleri farede hem kalıcı hem de geçici santral sinir sistemi iskemisinde araştırılmış ve TNF-alfa, IL-6 ve TGF-beta1'nin arttığı gösterilmiştir (13). Laküner infarktlı 113 hastanın kan örneklerinde IL-6, TNF-alfa ve intersellüler adezyon molekülü-1 seviyelerinin arttığı Castellanos tarafından gösterilmiş ve bu artışın kötü prognoz belirleyicisi olduğu vurgulanmıştır (14).

Deneysel alanda ve klinik uygulamada, strok sonrası sitokinlerin artışının gösterilmesi strokdaki enflamatuvar cevabın daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur. TNF-alfa ve IL-6'nın strokdaki enflamatuvar cevabı düzenlemesindeki rolleri dikkate alındığında bu sitokinlerin düzeylerini düşürmeye yönelik tedaviler akla yatkın olarak değerlendirilmektedir. Ancak deneysel alandaki başarılarla karşılık; strokta anti-enflamatuvar tedavilerin klinik pratiğe yansıyan yönü henüz gösterilememiştir (15,16,17).

Sonuçta bu çalışmada birer sitokin olan ve enflamasyonda önemli yer tutan TNF-alfa ve IL-6 düzeylerinin strok sonrası arttığı gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Kochanek, P.M., Hallenbeck, J.M.: Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*. 23: 1367-1379, 1992.
2. Sarıbaş, O.: Serebral iskemide inflamasyon ve sitokinler. *Türk Nörol Derg.* 1: 9-16, 1999.
3. Benveniste, E.N.: Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol*. 263: 1-16, 1992.
4. Clark, W.M., Rinker, L.G., Lessov, N.S., Hazel, K., Hill, J.K., Stenzel-Poore, M., Eckenstein, F.: Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke*. 31: 1715-20, 2000.
5. Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hesselbarth, D., Brinker, G., Hossmann, K.A.: A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 18: 367-75, 1998.
6. Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H.: Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 17: 472-6, 1986.
7. Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, J., Sharp, F.R.: A semi-automated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 10: 290-293, 1990.
8. Zhang, Z.G.: Ischemic stroke: From basic mechanisms to new drug development. Edited by Hsu C.Y. *Monographs in Clinical Neuroscience*, vol 16, Karger Basel, 1998, p. 46-64.
9. Gordon, M.S., Sosman, J.A.: *Clinical application of cytokines and biologic response modifiers*. Edited by Hoffman R., Benz E.J., Shattil S.J., Furie B., Cohen H.J., Silberstein L.E., McGlave P. Hematology Basic principles and practice. Churchill Livingstone, USA. 2000, p. 939-977.
10. Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z.: Tumor necrosis factor- in ischemic neurons. *Stroke*. 25: 1481-1488, 1994.
11. Selmaj, K.W., Farooq, M., Norton, W.T., Raine, C.S., Brosnan, C.F.: Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. *J Immunol*. 144: 129-135, 1990.
12. Kouwenhoven, M., Carlstrom, C., Ozenci, V., Link, H.: Matrix metalloproteinase and cytokine profiles in monocytes over the course of stroke. *J Clin Immunol*. 21: 365-75, 2001.
13. Hill, J.K., Gunion-Rinker, L., Kulhanek, D., Lessov, N., Kim, S., Clark, W.M., Dixon, M.P., Nishi, R., Stenzel-Poore, M.P., Eckenstein, F.P.: Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 820: 45-54, 1999.
14. Castellanos, M., Castillo, J., Garcia, M.M., Leira, R., Chamorro, A., Davalos, A.: Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke*. 33: 982-7, 2002.
15. Barks, J.D., Post, M., Tuor, U.I.: Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 29: 558-63, 1991.
16. Liu, X.H., Eun, B.L., Silverstein, F.S., Barks, J.D.: The platelet-activating factor antagonist BN 52021 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in the immature rat. *Pediatr Res*. 40: 797-803, 1996.
17. Hudome, S., Palmer, C., Roberts, R.L., Mauger, D., Housman, C., Towfighi, J.: The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 41: 607-16, 1997.