

Gabapentinin Spinal Kord İskemi-Reperfüzyon Yaralanması Sonrası İntraoküler Oksidatif Strese Etkisi

Effect of Gabapentin on Intraocular Oxidative Stress After Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury

Nil İrem UÇGUN¹, Zuhul YILDIRIM², Aydemir KALE³, Fikret DOĞULU³

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada gabapentinin, spinal kord iskemii-reperfüzyon yaralanması sonrası göz içi oksidatif strese etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yirmi dört adet Yeni Zelanda erkek tavşan 4 gruba ayrıldı; iskemii (n=6), kontrol (n=6), düşük doz gabapentin (30 mg/kg) (n=6) ve yüksek doz gabapentin (200 mg/kg) (n=6) tedavi grupları. İskemi ve tedavi gruplarında abdominal aorta 30 dakika anevrizma klemi ile renal arterin 1 cm altından ve iliak bifurkasyonun 1 cm üstünden klempe edildi. Kontrol grubuna yalnız laparotomi yapıldı. Hayvanlar 48 saat sonra sakrifiye edildi. Vitreus örnekleri analiz için alındı. Tümör nekroz faktör- α , oksidatif stres belirleyicileri olan malondialdehit ve total antioksidan statü düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Vitreusta oksidatif stres spinal kord iskemii-reperfüzyon yaralanması sonrasında artmaktadır. İskemii grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, iskemii grubunun vitreus malondialdehit ve tümör nekroz faktör- α düzeyleri anlamlı olarak artarken ($p<0.05$), total antioksidan statü düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.05$). Düşük doz ve yüksek doz gabapentin grupları iskemii grubu ile karşılaştırıldığında, vitreus malondialdehit ve tümör nekroz faktör- α düzeyleri anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), total antioksidan statü düzeyleri anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.05$). Düşük doz ve yüksek doz gabapentin grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, vitreus malondialdehit, tümör nekroz faktör- α ve total antioksidan statü düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Gabapentinin spinal kord iskemii-reperfüzyon yaralanması sonrası oluşan oküler oksidatif stresi azaltmada belirgin etkisi vardır.

Anahtar Kelimeler: Gabapentin, oksidatif stres, spinal kord yaralanması, tümör nekroz faktör- α , vitreus.

ABSTRACT

Purpose: In this study, we aim to research the effect of gabapentin on intraocular oxidative stress after spinal cord ischemia-reperfusion injury.

Materials and Methods: Twenty-four adult, male, New Zealand rabbits were divided into 4 groups; control (n=6), ischemia (n=6), low dose gabapentin (30 mg/kg), (n=6) and high dose gabapentin (200 mg/kg), (n=6) treatment groups. In ischemia and treatment groups, the abdominal aorta was clamped for 30 minutes by an aneurysm clip, approximately 1 cm below the renal artery and 1 cm above the iliac bifurcation. In the control group, only laparotomy was performed in the control group. The animals were killed 48 h later. Vitreous samples were collected for analysis. Levels of tumor necrosis factor- α , malondialdehyde, and total antioxidant status were analyzed as markers of oxidative stress.

Results: Oxidative stress is observed to increase in vitreous following spinal cord ischemia-reperfusion injury. In ischemia group the vitreous malondialdehyde and tumor necrosis factor- α levels were significantly higher ($p<0.05$) and total antioxidant status level was significantly lower compared to the control group ($p<0.05$). The vitreous malondialdehyde and tumor necrosis factor- α levels were significantly lower ($p<0.05$) and total antioxidant status significantly higher in low and high dose gabapentin groups compared to the ischemia group ($p<0.05$). When low and high dose gabapentin groups compared with control group, no significant difference were found between vitreous malondialdehyde, tumor necrosis factor- α , and total antioxidant status levels ($p>0.05$).

Conclusions: The experiments conducted in the present study show that gabapentin has a significant effects on lowering the oxidative stress in the eyes following a spinal cord ischemia-reperfusion injury.

Key Words: Gabapentin, oxidative stress, spinal cord injury, tumor necrosis factor- α , vitreous.

- 1- M.D., Second Ophthalmology Clinic, Ankara Numune Education and Research Hospital, 06100 Ankara, Turkey
UÇGUN N.İ., niliremucgun@yahoo.com.tr
- 2- M.D., Etimesgut Public Health Laboratory, 06770 Ankara, Turkey
YILDIRIM Z., zyildirim2004@yahoo.com
- 3- M.D., Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Gazi University, 06500 Ankara, Turkey
KALE A., aydemirkale@gmail.com
DOĞULU F., fdogulu@gazi.edu.tr

Geliş Tarihi - Received: 16.12.2011
Kabul Tarihi - Accepted: 07.02.2012
Ret-Vit 2012;20:50-53

Yazışma Adresi / Correspondence Address: M.D., Zuhul YILDIRIM
Etimesgut Public Health Laboratory, 06770 Ankara, Turkey
Phone: +90 544 411 15 94
E-Mail: zyildirim2004@yahoo.com

GİRİŞ

Spinal kord iskemi-reperfüzyon yaralanması oluşturduğu primer nörolojik hasarın yanında inflamasyon ve serbest radikal oluşumuyla sekonder hasara yol açar. Spinal kord iskemisi sonrası plazma ve dokuda nitrik oksit (NO), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve İleri düzey oksidasyon protein ürünleri (AOPP) düzeylerinde belirgin artış bildirilmektedir.^{1,2}

Gabapentin, kan-retina bariyerini geçerek Gama amino bütirik asit (GABA) agonisti gibi hareket eden sıklıkla GABA analogu olan bir amino asittir. GABA sentezini arttırabilir. GABA santral sinir sistemi ve retinal sensöryal nöronlarda inhibitör transmittedir.³⁻⁵ Gabapentin sıklıkla antiepileptik olarak kullanılan bir ilaçtır.^{6,7} Nöroprotektif olarak kullanılmasını öneren deneysel çalışmalar vardır.⁸

Çalışmamızda spinal kord iskemi-reperfüzyon yaralanmasının tedavisinde kullanılan gabapentinin vitreus içi oksidatif stres üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında, 24.02.2009 tarih ve G.Ü ET-09.014 nolu kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Tüm hayvanlara Ulusal Medikal Araştırma Derneği'nin belirlediği Ulusal Sağlık Enstitüsü'nce yayınlanan (NIH, No:85-23, 1986) laboratuvar hayvanlarına bakım prensiplerine göre bakılmıştır.

Çalışmada ağırlıkları 2.5-3 kg arasında değişen, 24 adet Yeni Zelanda erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar özel kafeslerde üç veya dörtlü gruplar halinde bir arada olacak şekilde optimal 18-21°C oda sıcaklığında tutularak, standart tavşan yemi ve normal musluk suyu ile serbest olarak beslendiler.

Tavşanlar dört gruba ayrıldı; iskemi (n=6), kontrol (n=6), düşük doz gabapentin (30 mg/kg), (n=6) ve yüksek doz gabapentin (200 mg/kg), (n=6) tedavi grupları.

Deneklere intramüsküler 50 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Turkey) ve 5 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul, Turkey) uygulanarak anestezi ve spontan solunum sağlandı. Erten ve ark.,⁹ tarif ettiği spinal kord iskemi-reperfüzyon modeli uygulandı. Tüm deneklere abdominal aorta 30 dakika anevrizma klempile ile renal arterin 1cm altından ve iliac bifurkasyonun 1 cm üstünden klempe edildi. Kontrol grubuna aynı cerrahi teknik uygulandı ancak aortik oklüzyon yapılmadı.

Kontrol grubundaki hayvanlara 25 ml normal salin, düşük doz gabapentin tedavi grubuna 30 mg/kg gabapentin (Pfizer), ve yüksek doz gabapentin tedavi

grubundaki deneklere 200 mg/kg gabapentin insizyon kapatıldıktan sonra periton içine verildi. Tüm denekler operasyondan 48 saat sonra pentobarbital (200 mg/kg) enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Tavşan gözlerine spekulum takıldı. Limbusun 4 mm gerisinden 20G enjektör ile girilerek vitreus örnekleri alındı. Vitreus örnekleri biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı. Vitreus tümör nekroz faktör- α (TNF- α), oksidatif stres belirleyicileri olan MDA ve total antioksidan statü (TAS) düzeyleri ölçüldü.

Biyokimyasal Analiz: Lipit peroksidasyonu Yoshioka ve ark.,¹⁰ tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) oluşumu yöntemi ile spektrofotometrik (Schimadzu UV 1601 spectrophotometer, Schimadzu, Tokyo, Japan) olarak ölçüldü. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. Sonuçlar standart eğriden hesaplanarak, nmol/mL olarak verildi.

Vitreus TNF- α düzeyleri enzim bağımlı immunosorbant assay (ELİSA) yöntemi ile Commercial 96-well ELİSA kiti (Thermo Scientific Rat TNF- α ELISA Kit USA, Cat No: ER3TNFA, Lot No: KE134857) kullanılarak ölçüldü.

Vitreus TAS düzeyleri Randox commercial kiti kullanılarak (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) (Randox TAS Manual Kit, Cat No: NX2332 Lot No: 115813) spektrofotometrik (Schimadzu UV 1601 spectrophotometer, Schimadzu, Tokyo, Japan) yöntem ile ölçüldü. Bu kit 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS)'nin peroksidaz (metmiyoglobin) ve H₂O₂ ile inkübe edilip, 600 nm'de absorbans veren stabil mavi-yeşil renkli ABTS radikali oluşumu prensibiyle çalışmaktadır.¹¹

İstatistik Analiz: Veriler, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 11.5, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis Varyans analizi ile incelendi, ikişerli karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U-testi ile yapıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tablo'da 4 grubun vitreus MDA, TNF- α ve TAS düzeyleri verilmiştir. İskemi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, iskemi grubunun vitreus MDA ve TNF- α düzeyleri anlamlı olarak artarken (p<0.05), TAS düzeyleri anlamlı olarak azalmış bulundu (p<0.05).

Düşük doz ve yüksek doz gabapentin grupları iskemi grubu ile karşılaştırıldığında, vitreus MDA ve TNF- α düzeyleri anlamlı olarak azalırken (p<0.05), TAS düzeyleri anlamlı olarak artmış bulundu (p<0.05).

Tablo: Tüm gruplara ait vitreus malondialdehit, tümör nekroz factor-a ve total antioksidan statü düzeyleri [Ortanca (min-max)].

Gruplar	İskemi (n=6)	Kontrol (n=6)	Düşük doz gabapentin (n=6)	Yüksek doz gabapentin (n=6)
MDA (nmol/mL)	3.846 (3.06-4.28)	1.298* (1.02-3.67)	1.234* (1.08-1.79)	1.259* (1.02-1.67)
TNF- α (pg/mL)	1.461 (1.45-1.55)	0.962* (0.90-1.09)	1.038* (1.03-1.09)	1.049* (0.82-1.25)
TAS (mmol/L)	0.572 (0.27-0.80)	1.044* (1.00-1.88)	1.206* (0.8-1.48)	1.230* (0.97-1.41)

*($p < 0.05$), iskemi grubuyla karşılaştırıldığında.

Düşük doz ile yüksek doz gabapentin grupları karşılaştırıldığında, vitreus MDA, TNF- α ve TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Düşük doz ve yüksek doz gabapentin grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, vitreus MDA, TNF- α ve TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$), (Tablo).

TARTIŞMA

Bulgularımız spinal kord iskemi-reperfüzyon yaralanması sonrasında göz içi oksidatif stresin arttığını göstermiştir. Spinal kord iskemisi nedeniyle salınan TNF- α 'nın vitreus düzeylerinde de artış bulunmuştur. Gabapentinin ise göz içi oksidatif stresi ve TNF- α düzeylerini düşürücü etkisi saptanmıştır.

Gabapentinin nistagmus tedavisinde kullanıldığında görme keskinliğinde belirgin artış sağladığı ve nistagmus şiddetini azalttığı bilinmektedir.^{2,12}

Gabapentinin hücrel mekanizmalardaki farmakolojik rolü tam anlaşılabilmiş değilse de bazı hipotezler öne sürülmektedir. Hayvan modellerinde antikonvülzan, antinoisepitif, anksiyolitik ve nöroprotektif etkinliğinde farklı mekanizmalar rapor edilmiştir.^{13,14}

Oral gabapentinin bulanık görme ve diplopi gibi yan etkileri mevcuttur. Visual evoke potansiyel ve elektoretinografide bozukluklara yol açtığı da bildirilmiştir. Bu antiepileptik ilacın görme yollarına, optik sinir fonksiyonlarına etkisi vardır. Bu etki geri dönüşümlüdür.³

Vigabatrin γ -aminobütirik asit GABA sistemine etkili başka antiepileptik ilaçtır. GABA konsantrasyonunu tüm dokularda artırır. Bu retinayı da etkiler. Retinadaki Vigabatrin birikimi görme alanında daralmaya sebep olur. Diğer gabaerjik ilaçlarda görme alanında etkilenme olmaz.¹⁵

GABA analoglarının ekstrasellüler alanda birikerek elektoretinogramda (ERG) b-dalgasında bozulmalara sebep olmaktadır.¹⁶

GABA geçici olarak bazı retina hücrelerinde bulunur. GABA inhibitör nörotransmitter olmasına karşılık retina gelişiminde rol oynar.¹⁷ Bu sebeple gabapentinin retina ve vitreusta oksidatif stresi azaltabileceğini düşünmekteyiz. Yine oküler yan etkileri olması ve düşük dozun yüksek doz kadar etkili olması göz önünde bulundurularak düşük dozu önermekteyiz.

Spinal kord iskemisi sonrası plazma ve hasarlı dokuda oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir. Bu iskeminin α -lipoik asit ve gabapentin gibi ajanlarla gerilediğini gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur.^{1,8}

Günümüzde artan deneysel hayvan modelleri farklı modellerde iskemi-reperfüzyon hasarını gözlememize ve etkili olabilecek yöntemleri uygulamamıza olanak sağlamıştır. Tavşan spinal kordu, infrarenal aortik oklüzyon sonrası iskemik hasara duyarlı olup, oklüzyon süresi ile histopatolojik ve klinik sonuçlar arasındaki düzgün ilişki nedeniyle iyi bir model olarak sıklıkla kullanılmaktadır.^{18,19} Bizde çalışmamızda bu nedenden dolayı iskemi-reperfüzyon modeli için denek olarak tavşanı seçtik.

Günümüzde medulla spinaliste hipoksik iskemik hasara yol açan hücrel ve moleküler mekanizmalar açıklanamasa da, geriye dönüşümsüz hücrel hasar sürecinin başlamasındaki en kritik olayın kalsiyum iyon homeostazisinin bozulması olduğu kabul edilmektedir.^{20,21} İskemi esnasında intrasellüler kalsiyum hızla çoğalmakta, artan intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu da nörotoksik eksitator aminoasitler olan glutamat ve aspartat salınımına neden olmaktadır. Sonrasında meydana gelen proteaz aktivasyonu ve reaktif oksijen radikalleri ile nöronal hasar kaçınılmaz olmaktadır.^{22, 23}

Reperfüzyon sırasında, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu, intrasellüler kalsiyum dengesini değiştirmektedir.

İntrasellüler kalsiyum artışı, proteaz ve endonükleaz aktivasyonu, mitokondriyal hasar, asidoz ve serbest radikal üretimi sonucunda nöronal hasar, apoptozis veya nekroz ile nörolojik disfonksiyona oluşmakta-

dır.²²⁻²⁴

Çalışmamızda düşük doz ve yüksek doz gabapentin tedavi gruplarında vitreus MDA, TNF- α ve TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Düşük doz ve yüksek doz gabapentin grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, vitreus MDA, TNF- α ve TAS düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadığı ve kontrol değerlerine yaklaştığı görüldü.

Çalışmamızda plazmada artan oksidatif stresin kanretina bariyerini geçerek vitreusta da arttığını gözlemledik. Bu bize vücutta herhangi bir bölgede oluşan iskemik patolojilerin oküler dokuları etkilediğini bir kez daha göstermektedir. Gabapentinin vitreus içi oksidatif stresi ve TNF- α düzeylerini düşürmesi diğer oküler patolojilerde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız spinal kord iskemi-reperfüzyon yaralanmasında oksidatif stresi ve buna gabapentinin etkisini araştıran ilk makaledir. Bu konuda başka araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Emmez H, Yıldırım Z, Kale A, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Acta Neurochir (Wien)* 2010;152:1591-601.
- Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, et al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 1997;765:283-90.
- Hilton EJH, Hosking SL, Betts T. The effect of antiepileptic drugs on visual performance. *Seizure* 2004;13:113-28.
- Verrotti A, Manco R, Matricardi S, et al. Antiepileptic drugs and visual function. *Pediatric Neurology* 2007;36:353-60.
- Czapiński P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2005;5:3-14.
- Traustason S, Eysteinnsson T, Agnarsson BA, et al. GABA agonists fail to protect the retina from ischemia-reperfusion injury. *Experimental Eye Research* 2009;88:361-6.
- Wallace SJ. Newer antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *Brain and Development* 2001;23:277-83.
- Kale A, Börcek AÖ, Emmez H, et al. Neuroprotective effects of gabapentin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *J Neurosurg* 2011;15:228-37.
- Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, et al. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord* 2003;41:533-8.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:372-6.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity, and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-12.
- McLean R, Proudlock F, Thomas S, et al. Congenital Nystagmus: Randomized, controlled, double-masked trial of memantine/gabapentin. *Ann Neurol* 2007;61:130-8.
- Stewart BH, Kugler AR, Thompson PR, et al. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharmaceut Res* 1993;10:276-81.
- Su T, Lunney E, Campbell G, et al. Transport of gabapentin, a g-amino acid drug, by system L a-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes and CHO cells. *J Neurochem* 1995;64:2125-31.
- Sills GJ, Butler E, Forrest G, et al. Vigabatrin, but not gabapentin or topiramate, produces concentration-related effects on enzymes and intermediates of the GABA shunt in rat brain and retina. *Epilepsia* 2003;44:886-92.
- Hanitzsch R, Küppers L, Flade A. The effect of GABA and the GABA-uptake-blocker NO-711 on the b-wave of the ERG and the responses of horizontal cells to light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42:784-91.
- Sharma RK. Developmental expression of GABA A receptors in retinal transplants. *Ophthalmic Res* 2000;32:45-51.
- Caparrelli DJ, Cattaneo SM, Bethea BT, et al. Pharmacological preconditioning ameliorates neurological injury in a model of spinal cord ischemia. *Ann Thorac Surg* 2002;74:838-44.
- Shi E, Jiang X, Kazui T, et al. Controlled low pressure perfusion at the beginning of reperfusion attenuates neurologic injury after spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:942-8.
- Tetik Ö, Gürbüz A. Spinal kord korunması. *Journal of Turkish Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2000;8:587-92.
- Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995;82:1026-60.
- Stys PK. White matter injury mechanisms. *Curr Mol Med* 2004;4:113-30.
- Ouardouz M, Nikolaeva MA, Coderre E, et al. Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel activation of ryanodine receptors. *Neuron* 2003;40:53-63.
- Tomes DJ, Agrawal SK. Role of Na⁺-Ca²⁺ exchanger after traumatic or hypoxic/ischemic injury to spinal cord white matter. *Spine J* 2002;2:35-40.