

İntraserebral kanamalı hastalarda serum fibroblast büyüme faktörü düzeyleri

Serum levels of fibroblast growth factor in patients with intracerebral hemorrhage

Ertuğrul Uzar ¹, Osman Evliyaoğlu ², Mehmet Uğur Çevik ¹, Adalet Arıkanoğlu ¹, Yavuz Yücel ¹,
Abdullah Acar ¹, Cüneyt Ölmez ³, Kağan Kamaşak ³

¹ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

³ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

ÖZET

Amaç: İntraserebral kanama inmenin en ölümcül alt tiplerinden birisidir. Beyinde bazik fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) anjiogenik, nörotropik ve damar genişletici özellikleri nedeniyle çok sayıda nörolojik hastalıkta bFGF'nin rolü araştırılmıştır. Şu ana kadar intraserebral kanamalı hastaların serumunda bFGF'yi araştıran sadece bir çalışma vardır. Bu çalışmanın birinci amacı intraserebral kanamalı hastaların serumunda bFGF artışı olup olmadığını araştırmaktır. Ayrıca ikinci amacımız intraserebral kanamalı hastalarda serum bFGF ile klinik durumla ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Akut dönemde 30 intraserebral kanamalı hastada serum bFGF seviyelerini ölçtük. Yaş ve cinsiyet yönünden benzer 30 sağlıklı kişi kontrol grubuna dahil edildi. ELİSA yöntemiyle serumda bFGF ölçüldü.

Bulgular: Serum bFGF seviyeleri intraserebral kanamalı hastalarda (12.89±3.23 ng/ml) kontrol grubuna (5.28±1.75 ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0.001). İntraserebral kanamalı (İSK) hastalarda ölenlerle (n=13) sağ kalanların (n=17) serum bFGF düzeyi benzerdi (13.49±4.13 ng/ml; 12.43±3.43 ng/ml, p>0.05). Ventriküle açılım gösteren (n=15) İSK'li hastalarla ventriküle açılım göstermeyen (n=15) hastaların bFGF düzeyi arasında fark bulunmadı (13.54±3.92 ng/ml; 12.24±2.29 ng/ml, p>0.05). İntraserebral kanamalı hastalarda serum bFGF düzeyi ile hematoma hacmi, Glaskow koma skalası ve uluslar arası inme skalası arasında ilişki bulunmadı (p>0.05).

Sonuç: İnsanlarda intraserebral kanamadan sonra artmış bFGF nöron koruyucu ve anjiogeneze neden olan mekanizmalardan birisi olabilir. *Klin Deney Ar Derg* 2011; 2 (3): 282-286.

Anahtar kelimeler: bazik fibroblast büyüme faktörü, intraserebral kanama, anjiogeneze.

ABSTRACT

Objectives: Intracerebral hemorrhage (ICH) is one of the most mortal subtypes of stroke. Due to the angiogenic, neurotropic, and vessel-dilating properties of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the brain, role of bFGF has been investigated in a number of neurological disorders. So far, there is only study about serum bFGF levels in patients with ICH. The first aim of the present research is to investigate whether increased serum bFGF in patients with ICH. Also, second aim was to study the association between serum levels of bFGF and clinical status in patients with ICH.

Materials and methods: We measured the serum levels of bFGF in 30 patients with ICH during acute period. Age and sex matched healthy subjects (n=30) were included in controls. Serum bFGF levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay method.

Results: The patients with intracerebral hemorrhage had higher serum levels of bFGF when compared with the healthy controls (12.89±3.23 ng/ml, 5.28±1.75 ng/ml; p=0.001). No statistically significant difference was determined between bFGF levels of the patients who died as compared to the patients who lived (13.49±4.13 ng/ml; 12.43±3.43 ng/ml, p>0.05). No statistically significant difference was found between bFGF levels of the patients with intraventricular hemorrhage as compared to the patients without intraventricular hemorrhage (13.54±3.92 ng/ml; 12.24±2.29 ng/ml, p>0.05). There was no correlation between serum bFGF, hematoma volume, Glaskow coma scale, and National Institutes of Health stroke scale (p>0.05).

Conclusion: The increased bFGF level may be one of the mechanisms that lead to angiogenesis and neuroprotection after ICH in human. *J Clin Exp Invest* 2011; 2 (3): 282-286.

Keywords: Basic fibroblast growth factor, intracerebral hemorrhage, angiogenesis.

Yazışma Adresi /Correspondence: Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul Uzar

Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Diyarbakır Email: ertuzar@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 05.08.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 21.08.2011

Copyright © Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

İntraserebral kanama (İSK) tüm inmelerin %10-15'ini oluşturur ve iskemik inmeden daha yüksek mortaliteye neden olur.¹ Anjiogenez fizyolojik ve patolojik durumlarda önceki kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiogenez vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi büyüme faktörleriyle kontrol edilir.

Deneysel çalışmalarda İSK'nin serebral anjiogenez neden olduğu ve VEGF salınımının arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle büyüme faktörleri ile anjiogenezin düzenlenmesi İSK'den sonra beyin hasarının azaltılmasında potansiyel bir hedef olabilir.^{2,3} Anjiogenik faktörler; ortamdaki fibroblast ve monosit gibi hücrelerden ve kollojen matriksin yıkılması sonucu ortaya çıkarlar. Anjiogenezisi uyaran en önemli sitokinler; VEGF ve bFGF'dir.^{3,4} bFGF'nin hedef hücreleri endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlardır.⁵ bFGF ile VEGF'nin ortaklaşa bir etkiye neden olduğu; bFGF'nin VEGF ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. bFGF'nin endotel aktivitesinin modülasyonu ve VEGF ekspresyonunu artırarak iki yolla anjiogenez katkıda bulunduğu ortaya konmuştur.^{5,6} Anjiogenez sürecinde bFGF'nin ekstrasellüler matriksin yıkımında görevli enzimlerin salınımına, hücre migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.⁷ Ayrıca bFGF'nin beyin lezyonlarından sonra rejenerasyon ve hücrenin yaşaması üzerinde etkileri de bilinmektedir.⁸ Güncel bir çalışmada serumda bazı büyüme faktörlerinin artışı ile İSK'den sonra hasarın iyileşmesi arasında olumlu ilişki gösterilmiştir.³

Anjiogenik, nörotropik ve vazodilatatör etkileri nedeniyle birçok nörolojik hastalıkta bFGF'nin etkisi araştırılmıştır. Deneysel İSK modelinde cerrahi hematoma boşaltılması sonrası lokal olarak verilen bFGF'nin sekonder nöronal hasarı önleyebildiği öne sürülmüştür.⁹ İnmeli hastalarda serum bFGF düzeyini araştıran sadece bir sayıda çalışma vardır ve hemorajik inmeli hastaların sayısı azdır.³ Bu nedenle İSK'li 30 hastada serum bFGF düzeylerini araştırarak İSK'nin patogenezinde bFGF'nin rolünü araştırmayı amaçladık. Ayrıca ilk kez serum bFGF'nin mortalite ve hematoma hacmi ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Kliniğine Ocak 2010–Nisan 2011 tarihleri arasında başvuran, anamnez, fizik ve nörolojik muayeneleri ayrıntılı olarak yapılan, nöroradyolojik inceleme ile İSK tanısı olaydan sonra 24 saat içinde kesinleştirilen, yatışı yapılarak takip ve tedavisi yapılan 30 hasta (11 Kadın, 19 Erkek) prospektif olarak değerlendirildi. Kronik nörolojik hastalık, kafa travması, üremi, karaciğer sirozu, kanser, kronik akciğer ve karaciğer hastalığını içeren sistemik hastalıklar öyküsü olanlar çalışma dışı bırakıldı. Benzer yaş ve cinsiyette (12 Kadın, 18 Erkek) vasküler risk faktörleri olmayan 30 sağlıklı gönüllü kontrol grubuna dahil edildi. Çalışmamız için lokal etik kurulu onayı alındı. Nöroloji bölümünde detaylı vasküler risk faktörlerinin öyküsü, kullanılan ilaç öyküsü, ayrıntılı nörolojik muayene, Glasgow koma skalası (GKS) ve kan basıncı kaydedildi.

Hastalarımıza ilk nörolojik değerlendirmeyi yapmak için uygulanan NIH inme skalası'nda; bilinç düzeyi, sorulara bilinçli yanıt, emirlere yanıt, ekstremiteler hareketler, görme alanı, fasyal paralizi, kol ve bacak motor hareketleri, ekstremiteler ataksisi, duyu, afazi, dizartri ve ihmalin derecesi puanlandırıldı.¹⁰ Çalışmaya alınan tüm hastalardan inme başlangıcından itibaren 24 saat içinde bFGF düzeyi ölçümü için, antekubital venden jelli tüpü 10 ml kan örneği alındı. Örnekler 20-30 dk. pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra 8000-10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar her hasta için ayrı eppendorf tüpe konulduktan sonra çalışma gününe kadar -50°C'de muhafaza edildi. Analizin yapılacağı gün dondurulmuş serum örneklerinin oda ısısında çözünmesi sağlandı. ELİSA yöntemiyle serumda bFGF (Human bFGF, Ray Biotech, GA, USA) ölçüldü.

Akut dönemde bilgisayarlı beyin tomografi radyoloji bölümünde yapıldı. Daha önce tanımlandığı gibi hematoma hacmi $A \times B \times C \times 0.5$ formülüne göre hesaplandı.¹¹ Ventrikül içinde kanama varlığı ve hidrosefali gelişmesi kaydedildi.

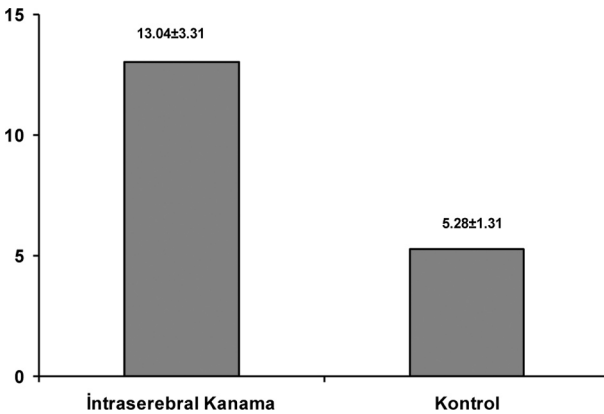
İstatistiksel Analiz

Sonuçların ortalama \pm standart sapma değerleri hesaplandı. İstatistiksel analiz SPSS 11.5 programı kullanılarak parametrik yöntemler ile yapıldı. İkili gruplar arası farklılık bağımsız T testi ve Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. İntraserebral

kanamalı hastalarda bFGF düzeyinin hematoma hacmi ve klinik parametrelerle korelasyonları Pearson korelasyon analizi ile belirlendi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi

BULGULAR

Kontrol grubu ile İSK'li hastalar yaş ortalaması (59.5 ± 18.3 ; 60.4 ± 11.9) ve cinsiyet (E/K; 18/12'ye karşı 19/11) yönünden benzerdi ($p > 0.05$). Serum bFGF seviyeleri İSK'li hastalarda (12.89 ± 3.23 ng/ml) kontrol grubuna (5.28 ± 1.75 ng/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p = 0.001$, Şekil 1). İSK'li hastalarda ölenlerle ($n = 13$) sağ kalanların ($n = 17$) bFGF düzeyi farklı bulunmadı (13.49 ± 4.13 ng/ml; 12.43 ± 3.43 ng/ml, $p > 0.05$). Ventriküle açılım gösteren ($n = 15$) İSK'li hastalarla ventriküle açılım göstermeyen ($n = 15$) hastaların bFGF düzeyi arasında fark yoktu (13.54 ± 3.92 ng/ml; 12.24 ± 2.29 ng/ml, $p > 0.05$). Hipertansiyon yükü olan ($n = 20$) ve olmayan ($n = 10$) İSK'li hastaların bFGF düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (12.96 ± 3.66 ng/ml; 12.75 ± 2.25 ng/ml, $p > 0.05$). İSK'li hastalarda sistolik kan basıncı ile bFGF ($p = 0.007$, $r = 0.48$) pozitif koreleydi. İSK'li hastalarda serum bFGF düzeyi ile hematoma hacmi, GKS ve NIH inme skalası arasında ile korelasyon bulunmadı ($p > 0.05$).



Şekil 1. İntraserebral kanamalı hastalarda ve kontrol grubunda serum bazik fibroblast büyüme faktör düzeylerinin (ng/ml) karşılaştırılması

TARTIŞMA

Akut inmeden sonra fonksiyonel iyileşme ve yara iyileşmesinde rol alan moleküler ve hücresel süreçte polipeptit büyüme faktörlerinin önemli rolleri

vardır. Eksitotoksisite, hipoksi, asidoz ve oksidan durumlardan beyni korumak için beyin hasarında farklı büyüme hormonlarının salınımı artar.^{2,9,12} İnmeli hastaların serumunda bFGF gibi büyüme faktörlerini araştıran çalışmalar az sayıdadır.^{13,14} bFGF'ninde dahil olduğu büyüme faktörlerinin terapötik potansiyeli, nörodejeneratif hastalıkları da içeren çeşitli hastalıkların tedavisi için yoğun bir inceleme altındadır. Tüm insan dokularında bFGF bulunur. Beyinde bFGF'nin ana kaynağı glial hücrelerdir fakat farklı nöron tiplerinden de ekspres edilir.¹⁵ Diğer fibroblast büyüme faktörleri ile birlikte bFGF sinir rejenerasyonu, kronik inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi farklı birçok süreçte önemli rol oynar. bFGF endotelial hücre migrasyonu, proliferasyonu ve diğer metabolik faktörleri etkileyen güçlü bir anjiogenik faktördür.¹⁶ İnmeli hastaların beyinlerinde anjiogenezin arttığı ve anjiogenezin yaşam süresi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. İnmeli hastaların çoğunlukla iskemik penumbra bölgesinde bFGF artışı bulunmuştur. Bu durum anjiogenez artışı ve kan akımının düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir.^{13,17} Toksik ve iskemik nöronal bozukluklara karşı bFGF nöronları korur.¹⁸ Deneysel inme sonrasında bFGF tedavisinin nörojenезisi artırdığı, infarkt hacmini azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir.^{19,20} Serebral iskemiden sonra VEGF ve bFGF artışının vaskularizasyon artışı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.²¹

Serebral iskemiden sonra nörolojik defisitlerin düzelmesi, nöronların yaşam süresini artırmak için anjiogenez önemli bir süreçtir. Serebral iskemiden sonra anjiogenez sürecinde bFGF'nin güçlü bir uyarandır. Aynı zamanda bFGF nörotropik ve damar genişletici özellikleri de vardır.¹⁷⁻²³ bFGF endotelial nitrik oksit sentezi artırması ile beyin kan akımını artırır.²³ Deneysel serebral iskemide bFGF'nin intravenöz verilmesi ile apoptozisi azalttığı da gösterilmiştir.²⁴ Anjiogenik, nörotropik ve damar genişletici özellikleri nedeniyle İSK'den sonra sekonder nöronal hasarı azaltmada bFGF önemli rol oynayabilir. Önceki bir çalışmada iskemik inmeli hastaların serumunda bFGF artışı bulunmuştur. Serebral infarktın sonra bFGF düzeylerinin üçüncü günde pik yaptığı, iki hafta yüksek düzeyde kaldığı ve infarkt alanı ile bFGF düzeyleri arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. bFGF endotel hasarından sonra endotel ve vasküler düz kas hücrelerinden salınır. Bu nedenle serebral hasardan sonra bFGF artışının kan beyin bariyerinin bozulması ile

ilişkisi de olabilir.²² Sağlıklı kişilerde bFGF oldukça düşüktür veya saptanamaz. Diyabetik hastalarda ve koroner arter hastalığı olanlarda serumda bFGF artışı bulunmuştur.²⁵ İSK'li hastalarda bFGF düzeyini araştıran şu ana kadar sadece bir çalışma vardır.¹³ Önceki bir çalışmada 16 İSK'li ve 20 iskemik in-meli hastanın serumunda bFGF düzeyi sağlıklı kontrollere göre belirgin düzeyde yüksek bulunmuştur.¹³ Bizim çalışmamızda da benzer şekilde İSK'li hastaların serumunda bFGF düzeyinde belirgin artış bulduk. Serum bFGF düzeyinin artışı İSK'li hastalarda akut İSK'dan sonra sekonder hasarı önlemek için koruyucu bir yanıt olabilir. Bizim çalışmamızda hasta sayımız önceki çalışmaya göre daha fazla sayıydı. Çalışmamızda önceki çalışmadan farklı olarak bFGF düzeyinin hematoma hacmi ve klinik bulgularla ilişkisi de araştırıldı. bFGF düzeyinin hematoma hacmi, mortalite, bilinç durumu ve NIH skoru ile ilişkisi olmadığı bulundu. Bu bulgular bFGF'nin prognostik bir belirteç olmadığını gösterdi. Çalışmamızda bFGF düzeyi ile sistolik kan basıncı arasında pozitif ilişki saptandı. Bu bulgu bFGF düzeyin vasküler değişikliklerden etkilenebildiğine işaret eder.

Sonuç olarak bu çalışma akut dönemde İSK'den sonra serum bFGF düzeyinde artışı gösteren ikinci çalışmadır. Bu hastalarda bFGF artışı beyin hasarını azaltmaya yönelik koruyucu bir cevap olabilir veya anjiogenezle ilişkili olabilir. İleri klinik çalışmalarla İSK'nin patogenezi ve prognozu ile ilişkisi araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: Secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 1996;27(3):373-80.
2. Tang T, Liu XJ, Zhang ZQ, Zhou HJ, Luo JK, Huang JF, Yang QD, Li XQ. Cerebral angiogenesis after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res* 2007;1175(1):134-42.
3. Sobrino T, Arias S, Rodríguez-González R, et al. High serum levels of growth factors are associated with good outcome in intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(12):1968-74.
4. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiogenez ve anti-anjiogenez tedavisi. *AÜTD* 2005;37(1): 1-6.
5. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997;18(1):26-45.
6. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries. An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1983;141: 1659-73.
7. Przybylski M.A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* 2009;18(12):516-9.
8. Seki T, Abdel Nazeer A, Sekimoto K, Guao Y, Al-jahdari W, Saito S. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor rescue growth cones of sensory neurites from collapse after tetracaine-induced injury. *Anesth Analg* 2010; 110(5):1468-72.
9. Kawakami N, Kashiwagi S, Kitahara T, Yamashita T, Ito H. Effect of local administration of basic fibroblast growth factor against neuronal damage caused by transient intracerebral mass lesion in rats. *Brain Res* 1995;697(1-2):104-11.
10. Lyden P, Brott T, Tilley B, et al. Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke* 1994;25(11):2220-6.
11. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996;27(8):1304-5.
12. Kawamata T, Speliotas EK, Finklestein SP. The role of polypeptide growth factors in recovery from stroke. *Adv Neurol* 1997;73:377-82.
13. Issa R, AlQteishi SKat A, Mitsios N, et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in the human brain following ischaemic stroke. *Angiogenesis* 2005;8(1):53-62.
14. Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000;31(8):1863-70.
15. Gonzales AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res* 1995;701(1-2):201-26.
16. Slavin J. Fibroblast growth factor at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int Rep* 1995;19(5):431-43.
17. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Wang M, Kumar S. Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke. *Lancet* 1993;342(8873):742-3.
18. Hu HW, Li XK, Zheng RY, Xiao J, Zeng JQ, Hou ST. bFGF expression mediated by a hypoxia-regulated adenoviral vector protects PC12 cell death induced by serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390(1):115-20.
19. Ma YP, Ma MM, Cheng SM, et al. Intranasal bFGF-induced progenitor cell proliferation and neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2008;437(2):93-7.
20. Li Q, Stephenson D. Postischemic administration of basic fibroblast growth factor improves sensorimotor function and reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol* 2002;177(2):531-7.
21. Wang JH, Liu N, Du HW, et al. Effects of adipose-derived stem cell transplantation on the angiogenesis and the expression of bFGF and VEGF in the brain post focal cerebral ischemia in rats. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2008;24(10):958-61.

22. Guo H, Huang L, Cheng M, Jin X, Zhao Y, Yi M. Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 2006;393(1):56-9.
23. Tanaka R, Miyasaka Y, Yada K, Ohwada T, Kameya T. Basic fibroblast growth factor increases regional cerebral blood flow and reduces infarct size after experimental ischemia in a rat model. *Stroke* 1995;26(11):2154-8.
24. Ay I, Sugimori H, Finklestein SP. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;87(1):71-80.
25. Zimering MB, Anderson RJ, Ge L, Moritz TE. Investigators for the VADT. Increased plasma basic fibroblast growth factor is associated with coronary heart disease in adult type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2011;60(2):284-91.