

SIÇANLARDA İNTRATEKAL UYGULANAN ESMOLOL'ÜN ANALJEZİK ETKİNLİĞİNİN VE NÖROTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Ertuğrul ÖĞÜN, Semih KÜÇÜKGÜÇLÜ, Bahar KUVAKI,
Osman YILMAZ, Alper BAĞRIYANIK, Ensari GÜNELİ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon (EÖ, SK, BK),
Laboratuvar Hayvanları Bilimi (OY), Histoloji ve Embriyoloji (AB, EG) Anabilim Dalları, İzmir**

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile sıçanlara intratekal uygulanan esmololün spinal düzeyde analjezik etkinliğinin olup olmadığı ve spinal korddaki histopatolojik etkisinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada 24 adet Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar dört gruba ayrılarak, 10 µL volüm içinde Grup 1'e %0.9 NaCl (kontrol grubu), Grup 2'ye 1 mg esmolol, Grup 3'e 2 mg esmolol, Grup 4'e 4 mg esmolol önceden yerleştirilmiş olan intratekal kateterden uygulandı. İlaç uygulamasından önce (0) ve uygulandıktan sonraki 5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda, sıçanlara "Tail-Flick" testi uygulandı. Motor blok değerlendirmesi de yukarıda belirtilen süre ve zaman aralıklarında gerçekleştirildi. Nörotoksitesite araştırması için medulla spinalisten kesitler alındı.

Bulgular: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grup 2 ve 3' de "Tail-Flick" süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken Grup 4' de "Tail-Flick" süreleri 5, 10, 20 ve 30 dakikalarda diğer gruplara göre anlamlı olarak daha uzun bulundu ($p<0.05$). Hiçbir grupta intratekal esmolol uygulaması sonrası motor blok gözlenmedi. Histopatolojik sınıflama tüm sıçanlarda skor 0 olarak değerlendirildi ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada sıçanlara intratekal uygulanan 4 mg esmolol bolus doz ile motor blok görülmeden 30 dakika süren analjezi sağlanmıştır. Ayrıca histopatolojik olarak nörotoksitesite bulgularına rastlanmamıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Sıçan, esmolol, analjezi

SUMMARY

EVALUATION OF THE ANALGESIC EFFICACY AND NEUROTOXICITY OF INTRATHECALLY ADMINISTERED ESMOLOL IN RATS

Objective: The aim of this study was to evaluate the analgesic effect and toxicity at spinal level when esmolol is administered intrathecally in rat.

Methods: In this study, 24 Wistar rats were used. The rats were divided into four groups: 0.9 % NaCl was administered intrathecally to Group 1 (control); esmolol 1 mg to Group 2; 2 mg to Group 3; 4 mg to Group 4 in 10 µL volume each. Tail-flick tests were performed on all groups, before administering drug (0) and at 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 minutes after drug administration. Motor block was also evaluated at these times. Samples of spinal cord were taken to evaluate neurotoxicity.

Results: When compared with the control group there was no difference in tail flick times between group 2 and 3. In the fourth group however the Tail-Flick times at 5, 10 20 and 30 min were significantly longer than in the other groups ($p<0.05$). Motor block did not developed in either group after IT administration of esmolol. There were no statistically significant histopathological changes and histopathological scores were 0 in each group ($p>0.05$).

Conclusion: In conclusion, this study, in which esmolol was used for the first time intrathecally, shows that 4 mg esmolol provides analgesia for 30 minutes without any motor block or histopathological toxicity.

KEY WORDS: Rat, esmolol, analgesia

GİRİŞ

Anestezi uygulamalarında alfa-agonistlerinin özellikleri ayrıntılı olarak araştırılmış olduğu halde, beta blokerler ile ilgili araştırmalar henüz sınırlıdır. Cunha ve ark (1) atenolol ve propranololün interleukin-8 (IL-8) ile uyarılmış hiperaljeziyi inhibe ettiğini bildirmiştir. Primer olarak anestezi sırasındaki hipertansiyon ve taşikardi tedavisinde endike olan esmololün, ağrı modülasyonunda da etkili olduğu öne sürülmüş (2), ancak postope-

ratif ağrı modülasyonundaki rolü henüz belirlenememiştir. Bir β-adrenerjik reseptör blokörü olan esmolol ile yapılan çalışmalar, esmololün ağrıyı modüle edebileceğini göstermektedir (2,3).

Yirmi beş yıl önce santral katekolamin salınımına etki eden ilaçların, anestezi ihtiyacını azaltabileceği savunulmuştur. β-adrenerjik reseptör blokörü, ilaçların sempatolitik etkileri dışında insanlarda anksiyolitik, hayvan-

larda ise santral sinir sistemi üzerine depresan etkileri gösterilmiştir (3). Nosisepsiyonda sempatik sistemin rolü iyi bilinmesine rağmen, duyuşal ve sempatik sinir sistemi arası bağlantı mekanizmaları açık değildir. Sempatik sistem, IL-8 gibi çeşitli mediyatörlerin salınımını potansiyalize ederek ve P maddesine olan duyarlılığı artırarak nosisepsiyonda rol almaktadır (1). Ayrıca spinal kordda ve locus ceruleustaki adrenerjik reseptörlerin agonistler ile uyarılmasının nosisepsiyonun inhibisyonunda major role sahip olduğu iyi bilinmektedir (2). Esmololün etkisini santral antinosisseptif blok ile gösterebileceği de öne sürülmektedir (4).

Intravenöz (İV) yolla uygulanan esmololün tam açıklanamayan mekanizmalarla da olsa analjezik etkinliğinin olması farklı yollarla uygulanmasının da analjezik etkinlik oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma ile sıçanlara intratekal (IT) uygulanan esmololün spinal düzeyde analjezik etkisinin ve ışık mikroskobu ile nörotoksitesitesinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındıktan sonra, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Hayvanların türü, bakım yeri ve koşulları:

Çalışmada 250–300 gr ağırlığında 24 erkek, Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar bir odada her biri ayrı kafeste olmak üzere kafeslere yerleştirilip, yiyecekleri kadar yiyecek ve su verildi. Hayvanlara 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ışık düzenlemesi yapıldı.

Kateter uygulaması ve uygulanacak anestezi:

Intratekal ilaç uygulaması için polietilen (PE) bir kateter (Portex® TM) intratekal olarak yerleştirildi. Bu işlem sırasında anestezi için intraperitoneal 80 mg kg⁻¹ ketamin verilip spontan solunum ve göz kırpmaya refleksleri korundu. İntratekal kateterizasyonlar, Yaksh ve Rudy'nin (5) 1976'da tanımladığı ve daha sonra 2004 yılında Korkmaz ve ark (6) modifiye ederek kullandıkları yöntem ile atlantoaksiyal membrandan gerçekleştirildi.

Kateter yerini doğrulamak amacıyla 2.gün 10 µL %2 lidokain uygulandı. Enjeksiyon sonrası 30 sn içinde arka bacaklarda paralizisi ve sürüklenme davranışının olması durumunda kateterin intratekal yerleştiği düşünüldü. Enfeksiyonu önlemek amacıyla sıçanlara kateter takıldığı günden itibaren 4 gün boyunca intraperitoneal 12 mg kg⁻¹gün⁻¹ gentamisin uygulandı.

Esmolol HCL (Brevibloc®, 10 mg flakon, Eczacıbaşı) Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (EBİLTEM) CHRIST Alfa1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Almanya) cihazı ile liyofilize edildi. Liyofilize olarak elde edilen örnekler Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı'nda 10 µL SF içerisinde 1, 2 ve 4 mg esmolol HCL olacak şekilde ampul şeklinde hazırlandı ve steril hale getirildi.

İlaç ve serum fizyolojik uygulamaları, intratekal kateterden Hamilton enjektörü (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, İsviçre) kullanılarak oda sıcaklığında ve 45 saniye içinde yapıldı.

Kateter implantasyonu sonrası 4. günde normal motor davranış gösteren sıçanlarda intratekal ilaç uygulamaya başlandı. Tüm gruplara ilaçlar; 10 µL volüm içinde verildi. Her ilacın uygulanmasından sonra kateter 10 µl %0,9 NaCl ile yıkandı.

Grup 1 (n=6): 10 µL %0.9 NaCl (kontrol grubu)

Grup 2 (n=6): 1 mg (0.1 mg µL⁻¹) esmolol HCL

Grup 3 (n=6): 2 mg (0.2 mg µL⁻¹) esmolol HCL

Grup 4 (n=6): 4 mg (0.4 mg µL⁻¹) esmolol HCL

“Tail-Flick” testi:

Analjezik etkinliği ölçmek için yapılan *tail-flick* testi “Tail-Flick cihazı” (Tf 0703 “Tail Flick”, May, Commat Ltd. Şti, Türkiye) ile gerçekleştirildi. İlaç uygulamasından bir gün önce tüm denekler ölçüm yapmaksızın “Tail-Flick” cihazına yerleştirilerek öğrenme alıştırmaları yapıldı. Termal uyarı kuyruğun 3 cm distali işaretlenerek uygulandı. Uyarının başlaması ile kuyruk çekilmesi arasındaki zaman kuyruk çekme (*tail-flick*) süresi olarak ölçüldü. Kuyruğun yaralanmasını engellemek için maksimum cevap alma süresi (*cut-off time*) 14.9 saniyeye ayarlandı. İlaç uygulamasından önce 0 (bazal) ve uygulamadan sonraki 5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda test yapıldı.

Motor blok değerlendirme:

Motor blok değerlendirmesi 5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dakikalarda yapılan *tail-flick* testini takiben, sıçanın düz bir zeminde yürümesi izlenerek arka bacaklarındaki motor kuvvet değerlendirildi. Yürümede zorlanan, arka bacaklarını tam olarak çekemeyip sendeleyerek sıçanlarda parsiyel blok geliştiği kabul edilmiştir.

Alt ekstremitelerdeki motor fonksiyon şu skala ile değerlendirildi (7):

- 0 Motor blok yok
- 1 Parsiyel blok
- 2 Tam blok

Hayvan yaşamını sonlandırma yöntemi:

Ölçümlerin sonunda kateterin yeri, 10 µL %2 lidokain uygulanarak enjeksiyon sonrası 30 sn içinde arka bacaklarda paralizi ve sürüklenme davranışı gözlemlenirken doğrulandı. Tüm denekler deney sonrasında intraperitoneal verilen 120 mg kg⁻¹ tiyopental ile sakrifiye edildi.

Histopatolojik İnceleme:

Sakrifiye edilen sıçanlara %4 paraformaldehit ile intrakardiyak perfüzyonu takiben medulla spinalisin servikal, torakal ve lumbal bölgelerinden örnekler alınıp %10 formalin ile saklanıp, hematoksin-eosin boyasıyla 4 ve 10 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Histopatolojik değerlendirme Malinovsky ve ark (8) araştırmalarında kullandıkları skorlamaya göre yapıldı:

0- Anormal hücre yok

1- Hemoraji, glial hücre reaksiyonu, aynı zonda birkaç alanda bu sürecin yayılımı

2- Gri maddede aşırı nekroz, hemoraji veya diğer lezyonların yoğunluğu

Çalışmadan çıkarılma kriterleri:

Deneklerde cerrahi işlemlere bağlı parapleji veya paraparazinin oluşması, kateter yerleştirildikten sonra test dozu ile parapleji oluşmaması, izlem sırasında enfeksiyon oluşması çalışmadan çıkarılma kriteri olarak kabul edildi.

İstatistik değerlendirme:

İstatistiksel analiz Windows için SPSS programının 11.5 versiyonu ile yapıldı. *Tail-flick* süreleri açısından çalışma gruplarının kontrol grubuna göre anlamlılığını saptamada Friedman testi kullanıldı. Gruplara bakılmaksızın, *tail-flick* sürelerinin hangi dakikalarda anlamlı olduğunun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Yine gruplar arası sıçan ağırlıkları

Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. İki grubun *tail-flick* sürelerinin karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

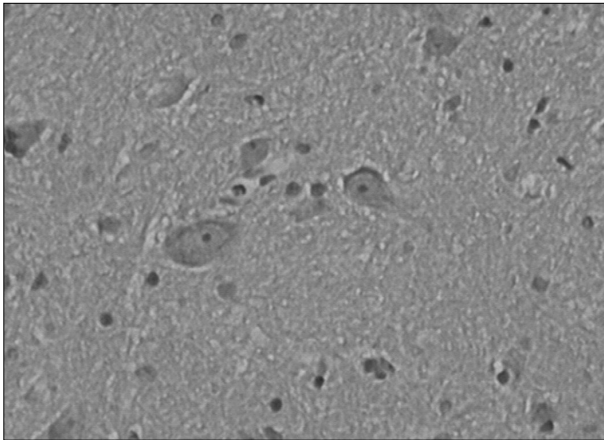
BULGULAR

Çalışma 24 adet erkek, Wistar cinsi sıçan ile yapıldı. Gruplardaki deneklerin vücut ağırlıkları ortalamaları Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te sırasıyla 238.16±10.43, 240.83±12.12, 235.33±10.21 ve 234.83±10.60 g olarak bulundu. Gruplar arasında vücut ağırlığı ortalama değerleri yönünden anlamlı fark saptanmadı (p=0.729).

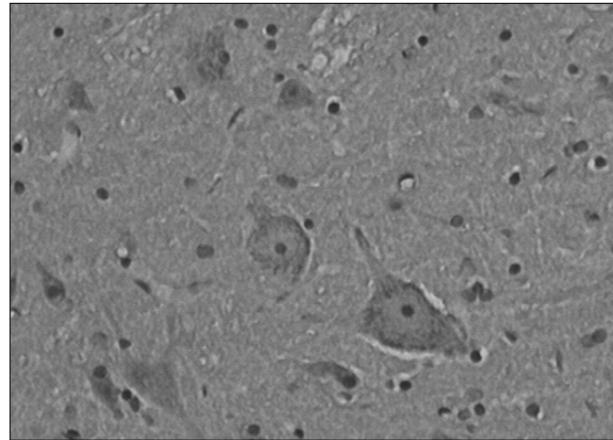
Grupların *tail-flick* sürelerinin 0. dakikaya göre grup içi karşılaştırmalarında; 4 mg IT esmolol uygulanan grup 4'te istatistiksel olarak anlamlı derecede uzama olduğu saptandı (p=0.004). Bu değerler kontrol grubu için p=0.201, 1 mg IT esmolol uygulanan grup 2 için p=0.241 ve 2 mg IT esmolol uygulanan grup 3 için p=0.093 olarak bulundu.

Kontrol grubuyla 4 mg esmolol uygulanan grubun tüm *tail-flick* süreleri karşılaştırıldığında; 5, 10, 20 ve 30. dakikalarda *tail-flick* sürelerinin Grup 4'te kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha uzun olduğu saptandı (p<0.05). Grup 2 ve Grup 3 ile kontrol grubunun (Grup 1) *tail-flick* sürelerinin karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05).

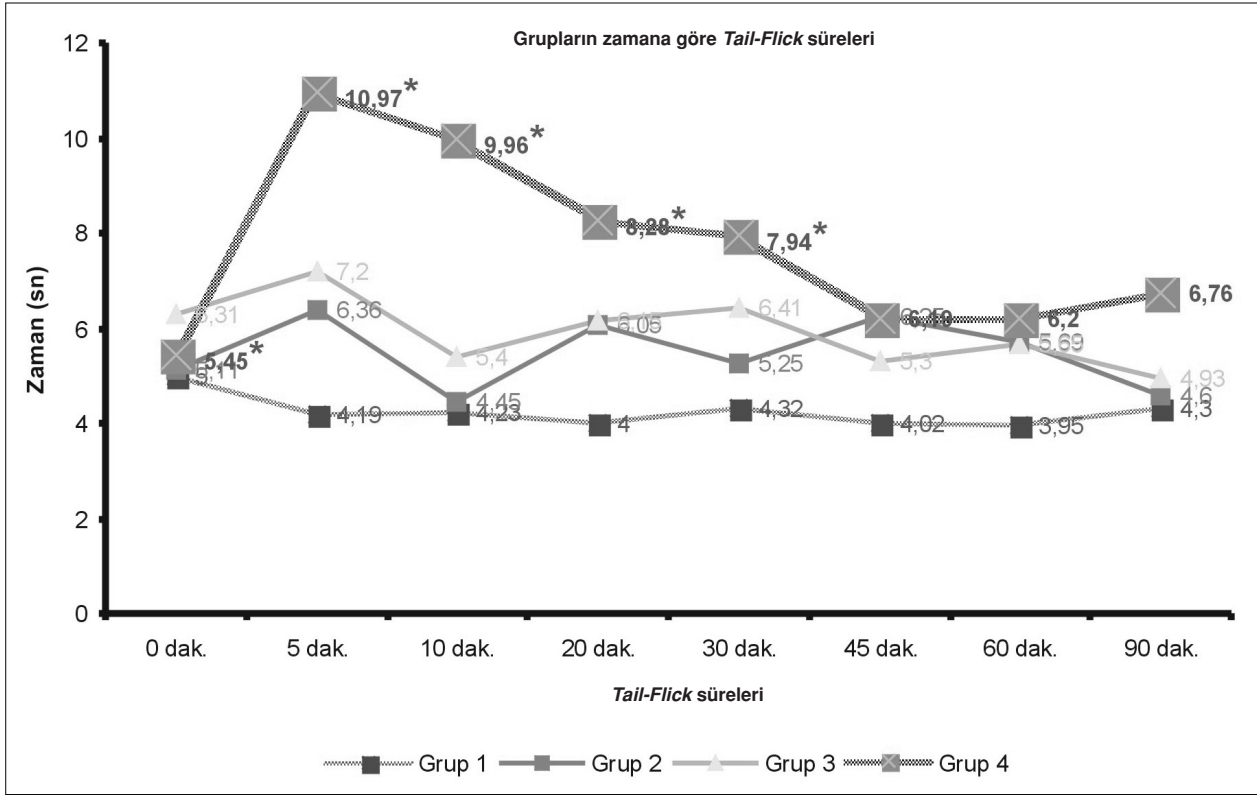
Gruplar arası değerlendirmede grup 2 ve grup 4 arasında 5. ve 10. dakikalarda; grup 3 ve grup 4 arasında ise sadece 5. dakikada anlamlı farklar elde edildi (p<0.05). Grup 4'te 4 mg IT esmolol uygulandıktan sonra maksimum analjezi 5. dakikada elde edildi ve bu süre ortalama 10.97±3.47 saniye olarak saptandı. Beşinci dakikadan sonra *tail-flick* sürelerinin zamanla kısalması ve 30. dakikadan sonra benzer değerlere ulaştığı belirlendi. Şekil 3'te tüm grupların zamana göre ortalama *tail-flick* sürelerinin dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 1: Kontrol grubu spinal kord örnekleme (HE x20)



Şekil 2. Grup 4 spinal kord örnekleme (HE x20)



* $p < 0.05$ gruplar arası karşılaştırmada

Şekil 3. Grupların ölçüm yapılan zamanlarda elde edilen ortalama Tail-Flick değerleri

Motor Blok Değerlendirmesi:

Yapılan motor blok değerlendirilmesinde; tüm gruplardaki deneklerde 5, 10, 20, 30, 45, 60 ve 90. dk motor blok gözlenmedi ve kullanılan skalaya göre 0 olarak değerlendirildi.

Histopatolojik inceleme:

Yapılan histopatolojik incelemede hiçbir seviyede herhangi bir doku düzeyinde yapısal değişiklik ya da gri madde nekrozu saptanmadı. Histopatolojik sınıflama tüm sıçanlarda skor 0 olarak değerlendirildi. Şekil 1'de kontrol grubunun ve Şekil 2'de grup 4'ün (4 mg esmolol) medulla spinalis örnekleri görülmektedir.

TARTIŞMA

Kısa etkili β_1 -adrenoseptör antagonistlerinden olan landiolol ve esmololün kardiyak inhibitör etkilerinin yanısıra hayvan ve insan araştırmalarında antinositif ve anestetik gereksinimini azaltıcı etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (3,9). Taira ve ark (9) spesifik bir β_1 -adrenoseptör antagonisti olan ONO 1101'in (landiolol) sıçanlarda intratekal uygulamasının formalin enjeksiyonu sonrasında ağrı davranışını azalttığını ve bu analjezik etkinin intratekal izoproteronol ile tamamen kaldırıldığını

bildirmişlerdir. Bu çalışmada intratekal uygulanan landiolol dozunun 0.5 mg olması ve ayrıca landiololün esmololden 9 kat daha güçlü olduğunun bilinmesi nedeniyle bizim çalışmamızda intratekal uygulanan esmololün dozu 4 mg olarak belirlenmiştir. Esmololün daha önceden herhangi bir çalışmada intratekal uygulanmamış olması ve etkinliğinin bilinmemesi nedeniyle farklı dozların da araştırılması amacıyla 1 ve 2 mg dozları da uygulandı.

Araştırmamızın sonuçlarına göre, 4 mg esmolol uygulanan grupta 30 dakika süreyle tail-flick değerlerinde anlamlı uzama saptanmıştır. İntravenöz esmololün 8-9 dakika gibi kısa etkili olduğu ve eritrositlerdeki esterazlar tarafından parçalandığı bilinmektedir (10). Bu çalışmada IT uygulanan esmolol 30 dakika etkinlik göstermiştir. Bu uzun etki süresi, beyin omurilik sıvısında (BOS) eritrosit olmamasına ve esmololün etkinliğinin bu nedenle uzamasına bağlı olabilir.

Childlow ve ark(11), sıçanlarda β_1 -adrenerjik reseptör antagonisti olan betaksololün sinir dokusu üzerinde bulunan Na^+ ve Ca^{++} kanallarını bloke ederek propranolol gibi lokal anestetik etki oluşturduğunu göstermiştir. Sıçanlara farklı dozlarda intratekal esmolol uygulanmış olan bu çalışmamızda, esmololün analjezik etkinliğinin mekanizması, benzer olarak Na^+ ve Ca^{++} kanallarını sant-

ral sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde bloke ediyor olması olabilir. Antinosisepsiyon için olası başka bir etki mekanizması opiyatların farmakokinetiklerini değiştirmesi ve inhibitör G proteinin etkisi olabilir (12). Ancak kısa etkili β 1- adrenoseptör antagonistlerinin antinosiseptif etkilerinin altında yatan direkt etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

Beta adrenoseptörler beyindeki retiküler sistemin çeşitli bölgelerinde özellikle bazal önbeynin mediyal septal bölgesinde bulunmaktadır. Ağrılı uyaranlar santral katekolamin konsantrasyonunu arttırmaktadır. β -reseptör antagonisti olan esmolol, hidrofilik yapısından dolayı kan-beyin bariyerini geçemediği halde, anestezi derinliği ve EEG aktivitesi üzerinde değişiklikler oluşturmaktadır, ancak mekanizması açıklanamamıştır (4). Yaksh ve Rudy (5) bir ilacın subaraknoid aralığa uygulanmasının, spinal düzeydeki etkilerini değerlendirmede en etkin yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bu yolla, spinal kordun farmakolojik ajanla direkt teması sağlanmış olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda esmololün santral bir kateterle BOS içine uygulanması tercih edilmiştir.

Çalışmamızda, sıçanlara IT uygulanan 1, 2 ve 4 mg dozlarındaki esmololün motor blok oluşturmadığı saptanmıştır. Esmololün beyin çeşitli bölgelerinde bulunan beta adrenoreseptörleri bloke ederek santral sempatolitik etki göstermesi ve motor nöronlar üzerine etkili olmaması nedeniyle, motor blok görülmeden analjezi sağladığı ileri sürülebilir.

Malinovsky ve ark (8) çalışmasına göre bir ilacın histopatolojik olarak nörotoksik olabilmesi için alınan dört seviyedeki kesitlerin hepsinde histopatolojik skorun Grade 2 olması yani gri cevherde belirgin nekroz, büyük hemoraji veya yaygın demiyelinizasyon, fibrozis ve inflamatuvar hücre varlığının görülmesi gerekmektedir. Sıçanlara IT 1 mg, 2 mg ve 4 mg dozlarında uygulanan esmololün, servikal, torasik ve lumbal seviyelerden alınan kesitlerin histopatolojik incelemesinde herhangi bir toksisite bulgusuna rastlanmamıştır. Çalışmamızda uyguladığımız dozlar ve seçilen histopatolojik inceleme yöntemine göre esmololün nörotoksik olmadığını ileri sürmek mümkündür. Ancak farklı dozlar ile ve daha ileri histopatolojik inceleme yöntemleri uygulanarak yapılacak olan araştırmalar bu konuda daha güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 765-7.
2. Davidson EM, Doursout MF, Szmuk P, Chelly JE. Antinociceptive and cardiovascular properties of esmolol following formalin injection in rats. *Can J Anaesth* 2001; 48: 59-64.
3. Johansen JW, Flaishon R, Sebel PS. Esmolol reduces anesthetic requirement for skin incision during propofol/nitrous oxide/morphine anesthesia. *Anesthesiology* 1997; 86: 364-71.
4. Menigaux C, Guignard B. Esmolol prevents movement and attenuates the BIS response to orotracheal intubation. *Br J Anaesth* 2002; 89: 857-62.
5. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiology Behavior* 1976; 17: 1031-6.
6. Korkmaz HA, Maltepe F, Erbayraktar S, Yılmaz O ve ark. Antinociceptive and neurotoxicologic screening of chronic intrathecal administration of ketorolac tromethamine in the rat. *Anesth Analg* 2004; 98: 148-52.
7. Karasawa S, Ishizaki K, Goto F. The effect of intrathecal administration of magnesium sulphate in rats. *Anaesthesia* 1998; 53: 879-86.
8. Malinovsky JM, Cozian A, Lepage JY, Mussini JM, Pinaud M, Souron R. Ketamin and midazolam neurotoxicity in the rabbit. *Anesthesiology* 1991; 75: 91-7.
9. Taira Y, Kakinohana O, Okuda Y, ONO 1101, A novel ultra-short acting β 1 blocker, can reduce pain behaviour in the rat formalin test. *Anesthesiology* 1998; A1128: 89.
10. Kaplan JA. Role of ultrashort-acting beta-blockers in the perioperative period. *Cardiothoracic Anesth* 1988; 2: 682-91.
11. Chidlow G, Melena J, Osborne NN. Betaxolol, a β 1-adrenoceptor antagonist, reduces Na^+ influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na^+ channels: comparison with other β -adrenoceptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 759-66.
12. Masaki E. Antinociceptive effects of landiolol and esmolol. *Masui* 2006; 55: 849-55.

Yazışma Adresi: Dr. Semih KÜÇÜKGÜÇLÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
35340 İnciraltı / İZMİR
Tel: 0 232 4122808
E-posta: semih.kucukguclu@deu.edu.tr