

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSKEMİ VE REPERFÜZYON SONRASI ERKEN
DÖNEMDE KAN BEYİN BARIYERİNİN
ZEDELENMESİNDE NİTRATİF VE OKSİDATİF
MEKANİZMALARIN FAREDE KRANİAL PENCERE VE
İZOLE RETİNA MODELLERİNDE İNCELENMESİ**

Dr. Atay VURAL

**Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2010**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSKEMİ VE REPERFÜZYON SONRASI ERKEN
DÖNEMDE KAN BEYİN BARIYERİNİN
ZEDELENMESİNDE NİTRATİF VE OKSİDATİF
MEKANİZMALARIN FAREDE KRANİAL PENCERE VE
İZOLE RETİNA MODELLERİNDE İNCELENMESİ

Dr. Atay VURAL

Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin GÜRSOY ÖZDEMİR

ANKARA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Turgay Dalkara
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Yasemin Gürsoy-Özdemir
Hacettepe Üniversitesi

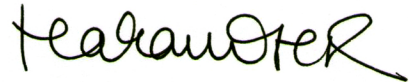
Üye: Prof. Dr. Emin Rüştü Onur
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Alp Can
Ankara Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Esen Saka Topçuoğlu
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez danışmanı olmanın ötesinde öğrencisi olan bizlere nörobilim sevgisini bulaştıran ve zengin bir bilimsel düşünce ve uygulama alanı hazırlamış olan ayrıca Tıp-Bilim Doktoru Bütünleşik Programının (MD-PhD) kurulmasında büyük emek sarf eden kişilerden birisi olarak genç yaşta bilimsel eğitim almamızı olanaklı kılan ve de bu tezin her aşamasında yol göstericilik yapan sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya,

İlk doktora öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum ve tez danışmanım olduğu için kendimi çok şanslı saydığım, gerek bilimsel gerekse kişisel kimliğiyle örnek aldığım, tez çalışmamın her aşamasında bana çok şey öğreten ve her zaman büyük bir özveriyle yardımcı olan sayın Doç. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir'e,

MD-PhD programının Hacettepe Üniversitesi'nde başlatılmasında ve süreç içinde karşılaştığımız bütün sıkıntıların giderilmesinde büyük bir samimiyetle, özveriyle ve şevkle çalışarak bize genç yaşta bilim eğitimi alabilmenin yolunu açan bütün hocalarıma, özellikle de hiçbir zaman yakın ilgilerini eksik etmeyen sayın Prof. Dr. İskender Sayek'e, Prof. Dr. Hakan Sedat Orer'e ve Doç. Dr. Alev Özön'e,

Bu tezin önemli bir kısmını oluşturan görüntüleme teknikleri konusundaki eğitimime büyük katkısı olan sayın Prof. Dr. Alp Can'a,

Bilgi ve birikimini nörobilim programına girdiğim ilk günlerden itibaren benimle paylaşan sayın Yrd. Doç. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a, laboratuvarını her ihtiyacım olduğunda açarak candan ilgisini esirgemeyen Dr. Ebru Bodur'a,

Birlikte çalışmaktan hep büyük keyif duyduğum, kendilerinden çok şey öğrendiğim ve yardımlarına sık sık başvurduğum arkadaşlarım Dr. Hülya Karataş Kurşun, Uzm. Sevda Lüle, Dr. Emine Eren Koçak'a ve teknisyen Mesut Fırat'a, peroksinitrit çalışmalarında yardım eden Dr. Şahin Khaniyev'e ve her ihtiyaç duyduğumda yardımcı olan Farmakoloji bölümündeki bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Son olarak bana her zaman sınırsız destek veren sevgili aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yapılabilmesinde verdikleri proje desteği nedeniyle Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığı'na ve Beyin Araştırmaları Derneği'ne, ayrıca yurt içi doktora burs programıyla desteğini sunan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖZET

Vural, A. İskemi ve reperfüzyon sonrası erken dönemde kan beyin bariyerinin zedelenmesinde nitratif ve oksidatif mekanizmaların farede kranial pencere ve izole retina modellerinde incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı Doktora Tezi, Ankara, 2010. İskemi/reperfüzyon sırasında, nörovasküler üniteye meydana gelen değişiklikler mikrosirkülasyonun bozulmasına ve enfarkt alanının penumbraya doğru genişlemesine sebep olmaktadır. Trombolitik ve nöroprotektif ajanlar bu durumu düzeltmekte yetersiz kalmaktadır. Önceki çalışmalarda *ex vivo* histolojik yöntemlerle iskemi/reperfüzyon sonrası mikrodamarlarda boğumlanmalar olduğu ve boğumlanmaların arasında eritrositlerin hapsoldüğü gösterilmiş, peroksinitritin (oksidatif ve nitratif strese yol açan bir radikal) bu boğumlanmaların oluşumunda rolü olduğu saptanmış ve bu boğumlanmaların perisitlerin kasılmasına bağlı olabileceği önerilmişti. Bu tez çalışmasında ilk olarak önceki bulguların *in situ* test edilmesi amacıyla iskemi sırasında ve sonrasında mikrodolaşımda meydana gelen değişikliklerin ve ek olarak bu değişikliklerin peroksinitritle olan ilişkisinin intravital görüntüleme yöntemleriyle incelenmesi hedeflendi. Daha sonra perisitlerin bu değişikliklerde oynadıkları rolün direkt gözlenmesi amacıyla retina mikrodamarları izole edilerek, OGD ve peroksinitrit uygulanmasına cevapları mikroskop altında incelendi. Son olarak, peroksinitritin kan beyin bariyeri hasarında rolü olan MMP-2 ve 9 üzerindeki etkisi zimografi yöntemiyle çalışıldı. Intravital görüntüleme için kranial pencere açıldıktan sonra farelere FITC-Dekstran verildi ve orta serebral arter tıkanması gerçekleştirildi. Flüoresan görüntülerde 2 saat iskemi sonunda mikrodamarların $56 \pm 3\%$ 'ünde, takip eden 2 saat reperfüzyonun sonunda ise $62 \pm 3\%$ 'ünde kesintiler tespit edildi ($n=3$). Bu kesintilerin içinde eritrositlerin hapsoldüğü saptandı. Reperfüzyondan önce verilen PBN (serbest radikal temizleyicisi) boğumlanmış damar oranını anlamlı derecede azaltarak $30 \pm 4\%$ 'e düşürdü ($n=3$). Topikal peroksinitrit uygulanması, mikrodamarların $54 \pm 4\%$ 'ünde ($n=3$) segmental darlıklara yol açarken ebselen (peroksinitrit temizleyici molekül) verilen grupta bu oran $28 \pm 3\%$ 'e ($n=3$) düştü. İzole retina mikrodamarlarında perisitlerin OGD'ye cevaben kasılarak komşu damar çapını bazalin $62 \pm 4\%$ 'üne indirdikleri gözlemlendi ($n=9$). Reoksijenizasyon sıvısına geçilmesi ile bu oran değişmezken ($61 \pm 9\%$, $n=3$) reoksijenizasyon sıvısına PBN eklenen grupta düzelme ($87 \pm 4\%$) saptandı ($n=5$). Zimografi çalışmasının ilk bulguları düşük konsantrasyonlardaki peroksinitritin ($1-10 \mu\text{M}$) MMP-9 aktivasyonuna yol açabileceğine işaret etmektedir. Bu bulgular iskemi ve reperfüzyonun patofizyolojisinde peroksinitrit aracılı perisit disfonksiyonunun ve buna bağlı mikrodolaşım bozukluğunun rolü olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikrodolaşım, intravital görüntüleme, peroksinitrit, perisit, retina mikrodamar izolasyonu, MMP, zimografi

Bu çalışma HÜAF ve Beyin Araştırmaları Derneği (BAD) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Vural, A. Effects of nitritative/oxidative stress mechanisms on early blood brain barrier injury after ischemia/reperfusion studied by cranial window and isolated retina models. Hacettepe University, Institute of Health Sciences PhD Thesis in Basic Neurological Sciences (Neuroscience), Ankara, 2010. Ischemia/reperfusion may disrupt microcirculation and promote progression of the infarct to the penumbra. Although there are strategies for opening of occluded artery via thrombolytic agents and protection of cell death with neuroprotective agents, they are yet inadequate in clinical trials. Previously, microvascular constriction after ischemia/reperfusion was demonstrated *ex vivo* in histological sections through increased peroxynitrite (an oxidative and nitritative radical) production. Pericytes may actively contract and cause these constrictions. First aim of this thesis is to test mentioned findings about vascular constriction and the role of pericytes in these constrictions *in situ* (live animal model) by investigating microcirculatory changes during and after 2 hours of ischemia/reperfusion and after topical application of peroxynitrite with help of intravital microscopy. Second aim is to directly observe changes in pericytes after OGD or peroxynitrite application in isolated retinal microvessel preparation. Third aim is to study the effect of peroxynitrite on MMP-2 and 9 activation which were shown to play an important role in blood brain barrier damage by gelatin zymography method. For intravital imaging experiments, first a cranial-window was opened and FITC-Dextran was injected to mice and MCA occlusion was induced. Fluorescent images revealed that constrictions were detected on $56 \pm 3\%$ of microvessels at the end of 2 hours of ischemia and following 2 hours of reperfusion this ratio was $62 \pm 3\%$ ($n=3$). Entrapped erythrocytes were detected around these constrictions. PBN, a free radical scavenger, given before reperfusion significantly decreased the ratio of capillaries displaying constrictions to $30 \pm 4\%$ ($n=3$). Peroxynitrite caused segmental constrictions on $54 \pm 4\%$ of capillaries ($n=3$) while peroxynitrite scavenger ebselen significantly reduced peroxynitrite-induced capillary constrictions to $28 \pm 3\%$ ($n=3$). During OGD of isolated retinal microvessels, pericyte contraction was observed and neighbouring vessel diameter was reduced to $62 \pm 4\%$ of its baseline value ($n=9$). After reperfusion with normoxic and normoglycemic solution, this ratio was detected $61 \pm 9\%$ ($n=3$). After addition of PBN to reperfusion solution, this ratio increased to $87 \pm 4\%$ ($n=5$). Findings of the gelatin zymography study were preliminary. Results imply that lower concentrations of peroxynitrite ($1-10 \mu\text{M}$) may cause MMP-9 activation. The results of this thesis showed that microcirculatory constrictions were also present in *in-situ* ischemia/reperfusion model and after direct application of peroxynitrite which were resolved with scavenging agent. During direct retinal pericyte examinations pericytes constricted after OGD and peroxynitrite applications.

Key Words: Microcirculation, intravital imaging, pericyte, peroxynitrite, isolation of retinal microvessels, MMP, zymography

This study is supported by HÜAF and Brain Research Foundation (BAD).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Serebral Mikrosirkülasyonun Anatomisi	4
2.2. Serebral Mikrosirkülasyonun Histolojisi	14
2.2.1. Perisitler	16
2.3. Mikrovasküler Reoloji ve Hemodinami	20
2.4. Endotel-Kan Hücresi Etkileşimleri ve Kapiller Kan Akımı	27
2.5. Kan Beyin Bariyeri	29
2.6. Matriks Metalloproteinazlar	30
2.7. Peroksinitrit	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Deney Hayvanları ve Anestezi	33
3.2. Serebral Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelenmesi Çalışmasında Kullanılan Deney Grupları	33
3.3. İntraarteriyel Kateterizasyon	34
3.4. Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli	34
3.5. Kraniyal Pencere Açılması	35
3.6. Topikal Peroksinitrit Uygulanması	36

	Sayfa
3.7. Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelenmesi	37
3.7.1. Donanım ve Yazılım	38
3.7.2. Analiz	39
3.8. Damar İçerisine Hapsolmuş Eritrositlerin Sodyum Borohidrit Boyaması ile Gösterilmesi	40
3.9. İzole Edilmiş Retinal Mikrodamarların <i>in vitro</i> Görüntülenmesi Deneyleri	41
3.9.1. Deneylerin Yapılışı	41
3.9.2. Deney Grupları	42
3.9.3. Görüntüleme ve Analiz	43
3.10. Matriks Metalloproteinazlar ile Peroksinitrit Etkileşiminin Jelatin Zimografi Yöntemiyle İncelenmesi Çalışması	44
3.10.1. Deney Grupları	44
3.10.2. Peroksinitrit Sentezi	45
3.10.3. Zimogram Jelinin Sentezi	47
3.10.4. Jelatin Zimografi Deney Protokolü	48
3.10.5. Zimogram Jellerinin Görüntülenmesi	50
3.11. İstatiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. Serebral Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelendiği Çalışmanın Bulguları	51
4.1.1. Deney Protokolünün Yerleştirilmesi	51
4.1.2. İskemi/Reperfüzyon Grubu	52
4.1.3. Topikal Peroksinitrit Uygulaması	58
4.2. İzole Edilmiş Retinal Mikrodamarların <i>in vitro</i> Görüntülenmesi Çalışması Bulguları	59
4.3. Matriks Metalloproteinazlar ile Peroksinitrit Etkileşiminin Jelatin Zimografi Yöntemiyle Görüntülenmesi	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR	71

KAYNAKÇA

72

EKLER

EK 1

SİMGELER VE KISALTMALAR

δ-GTP:	δ- glutamil transpeptidaz
Anti- SMA:	anti-Düz Kas Aktini (Smooth Muscle Actin)
AP:	Alkalen Fosfotaz
BKH:	Beyaz Kan Hücreleri
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
CO ₂ :	Karbondioksit
DIC:	Differential Interference Contrast
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
Ebselen:	2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on
EYT:	Endotel Yüzey Tabakası
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC:	Flüoresan İzotiyosiyanat
HRP:	Horse Radish Peroxidase
i.p. :	Intraperitoneal
KBB:	Kan Beyin Bariyeri
MMP:	Matriks Metalloproteinazlar
MnO ₂ :	Mangan Dioksit
NaBH ₄ :	Sodyum Borohidrit
NO:	Nitrik Oksit
OGD:	Oksijen Glukoz Deprivasyonu
OSA:	Orta Serebral Arter
PBN:	<i>N-tert-bütil-α-fenilnitron</i>
PBS:	Fosfat Tamponlu Salin
PDGFR-β:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü β
PGH ₂ :	Prostoglandin H2
PGI ₂ :	Prostoglandin I2
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SF:	Serum Fizyolojik
tPA:	Doku plazminojen aktivatörü

TEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGF β -1:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β -1
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
yBOS:	Yapay Beyin Omurilik Sıvısı

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Pial arter ve venlerin korteks yüzeyindeki seyirleri	5
Şekil 2.2. Kortikal arter ve venlerin uzunluklarına göre çeşitleri	8
Şekil 2.3. Kortikal kapiller ağ tabakalarının kortikal nöronal tabakalarla ilişkisi ve yoğunluk dağılımı	10
Şekil 2.4. İntrakortikal arterlerin venler etrafındaki hegzagonal yerleşimi	12
Şekil 2.5. Kortikal damarlar arasındaki anastomozlar	13
Şekil 2.6. Geçit kanalı (thoroughfare channel)	14
Şekil 2.7. Mikrodamarların histolojik yapısı	15
Şekil 2.8. Perisitler ve perisitler arasındaki bağlantılar	17
Şekil 2.9. Perisitlerin endotele cevaben kasılması	19
Şekil 2.10. Tabakalar arası kayma gerilimi	20
Şekil 2.11. Newtonian ve Newtonian olmayan sıvılarda viskozite	21
Şekil 2.12. Damar çapı-viskozite ilişkisi	23
Şekil 2.13. Kan basıncı ve akım hızının damarsal yatakta dağılımı	24
Şekil 2.14. Faz ayrımı	24
Şekil 2.15. Hematokrit ile viskozite ilişkisi	25
Şekil 2.16. Eritrositin boyutları	26
Şekil 2.17. Endotel yüzey tabakası	28
Şekil 2.18. Kan beyin bariyeri elemanlarının şematik gösterimi	30
Şekil 2.19. Kollajenazların yapısı	31
Şekil 2.20. Peroksinitritin oluşumu	32
Şekil 3.1. İntraluminal filaman modelinde kullanılan tıkama ipi	35
Şekil 3.2. İntraluminal filaman metodu ile OSA orijininin tıkanması	36
Şekil 3.3. Peroksinitrit konsantrasyonunun hesaplanması	37
Şekil 3.4. İntravital görüntüleme deneyleri iskemi/reperfüzyon grubu deney şeması	38

	Sayfa
Şekil 3.5. Görüntülemeye kullanılan mikroskoplar	39
Şekil 3.6. Görüntüleme ile elde edilen verilerin analiz yöntemi	40
Şekil 3.7. İzole edilmiş retinal mikrodamarların <i>in vitro</i> görüntülenmesi deneylerinde kullanılan teçhizatlar	43
Şekil 3.8. Peroksinitrit sentezinin şematik gösterilmesi	45
Şekil 3.9. Peroksinitrit oluşumunun basamakları	46
Şekil 3.10. Jel Zimogram için jel dökülme aşamaları	48
Şekil 4.1. İskeminin sonrası kan beyin bariyerinin açılması	52
Şekil 4.2. İskemi/reperfüzyon sırasında mikrovasküler yatakta boğumlanmalar	53
Şekil 4.3. 100 kat büyütmede kesintili mikrodamarların görünümü	54
Şekil 4.4. Eritrosit rulolarının takıldığı boğumlanmaların arasındaki ince plazma şeritleri	54
Şekil 4.5. Histolojik kesitte hapsolmuş eritrositler ve perisit	55
Şekil 4.6. İskemi/reperfüzyon sırasında PBN tedavisinin etkisi grafiği	56
Şekil 4.7. Reperfüzyondan hemen önce PBN verilen grupta mikrodamarların görünümü	57
Şekil 4.8. Topikal peroksinitrit uygulanmasını takiben mikrodamarların görünümü	58
Şekil 4.9. Topikal peroksinitrit uygulanması sırasında Ebselen tedavisinin etkisi grafiği	59
Şekil 4.10. OGD'yi takiben perisitlerin kasılarak şekil değiştirmesi ve komşu lümen çapını daraltması	60
Şekil 4.11. OGD sonrası ve reoksijenizasyon sırasında, PBN tedavisi verilen ve verilmeyen grupların lümen çapı yüzde değişimleri	61
Şekil 4.12. Peroksinitrit uygulaması sonrası perisitlerin kasılarak şekil değiştirmesi ve komşu lümen çapını daraltışı	61

Sayfa

Şekil 4.13.	MMP-9 standart proteinleri ile elde edilen jel zimografi görüntüsü	62
Şekil 4.14.	Peroksinitrit etkisiyle MMP aktivasyonunun incelendiği deneyin jel görüntüsü	63

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Beyin ve retinadaki perisit ve düz kas hücrelerindeki kasılma özelliğine sahip proteinlerin karşılaştırılması	18
Tablo 3.1. Zimogram jeli tarifi	47

GİRİŞ

İnme tedavisinde, trombolitik tedavi kullanımı ile tıkalı arterin açılması umut vaat edici bir gelişme olmuştur. Ancak yeniden kanlanmanın sağlanması reperfüzyon hasarını beraberinde getirmiş, fonksiyonel düzelme beklenildiği kadar tatmin edici olmamış ve bazı hastalarda gelişen ödem ve kanama ise morbidite ve mortaliteyi artırmıştır. Hayvan modellerinde başarılı olan pek çok nöroprotektif tedavinin ise hiç birisi klinik çalışmalarda başarıya ulaşmamıştır. Bu durumun sebebi tıkalı damarın açılması ile büyük damarlarda kan akımı sağlanmasına rağmen mikrosirkülasyonun tıkalı kalmaya devam etmesi ve doku reperfüzyonunun sağlanamaması olabilir.

İskemi ve reperfüzyon sırasında mikrosirkülasyonda mikrodolaşım düzeyinde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Tıkalı arter açılrsa bile kan hücreleri, fibrin ve şişmiş astrosit son ayakları tarafından tıkanmış olan mikrodolaşımda kan akımının sağlanamadığı (*no-reflow* fenomeni) kemirgen ve primat deneylerinde önceki çalışmalarla gösterilmiştir (1-3). Prekapiller arterioller genelde açık kalırken, postkapiller venüller adheran lökositler, fibrin, eritrosit ve trombositlerden oluşan agregatlar nedeniyle tıkanmaktadır (4). Endotel hücreleri, bu hücreler arasında yer alan sıkı kavşak proteinleri, astrosit son ayakları, perisitler, nöronlar, bazal lamina, beyin ekstraselüler matriks proteinleri ve enzimlerinden oluşan nörovasküler birimin hasar görmesi mikrodolaşımın bozulmasına neden olabilir. Örneğin, önceki çalışmalarda şişmiş astrosit son ayaklarının ve endotel hücrelerinin kapiller damarlarda segmental darlıklara yol açtığı öne sürülmüştür (5).

Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada fare serebral mikrodamarlarında iskemi ve reperfüzyonu takiben boğumlanmaların olduğu *ex vivo* olarak histolojik yöntemlerle gösterilmiş ve bunda oksidatif-nitratif hasarın önemli rolü olduğu tespit edilmişti. Perisitlerin de bu boğumlanmalardan sorumlu olabileceği düşünülmüştü (6). Perisitler komşu astrosit ve nöronlardan gelen kimyasal uyarılara cevaben kasılıp gevşeyerek kapiller kan akımının fizyolojik düzenlenmesinde önemli rol oynayan hücrelerdir (7). Bu hücreler iskemi ve reperfüzyon sırasında

mikrovasküler yatakta yoğun olarak oluşan oksijen ve nitrojen radikalleri nedeniyle hasara uğrayabilirler (8). Bu tezde fare serebral mikrodamarlarıyla ilgili önceki çalışmalarımızdaki *ex vivo* gözlemlerimizin intravital görüntüleme yöntemleriyle canlı farelerde *in situ* test edilmesi amaçlanmaktadır. Bu yöntem sayesinde mikrodamarların iskemi ve reperfüzyonun farklı aşamalarındaki durumu ve peroksinitrit uygulanmasına verdikleri cevap eş zamanlı olarak incelenebilecektir. Perisitlerin oksijen glukoz deprivasyonuna (OGD) ve peroksinitrit uygulanmasına verdikleri cevabın direkt olarak gözlenebilmesi için de retina mikrodamarlarının izole edilerek mikroskop altında incelenmesi amaçlanmıştır.

Reperfüzyon hasarında, nitrik oksit (NO) ve süperoksit düzeylerinin artması ve eş zamanlı olarak meydana gelen bu radikallerin birbirleri ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit önemli rol oynar. Tekrar kanlanma ile mikrodolaşımda oluşan peroksinitritin, reperfüzyon ile tetiklenen kan beyin bariyeri (KBB) bozukluğundan sorumlu esas etkenlerden biri olabileceği gösterilmiştir (9, 10). Bu çalışmalarda peroksinitrit oluşumunun özellikle beyinde mikrodamarlar ve bunları sıkıca çevreleyen astrosit son ayaklarında yoğunlaştığı bildirilmiştir. Bu bulgular mikrodolaşımda meydana gelen hasar ile peroksinitrit arasında bir bağlantı olduğu görüşünü desteklemektedir. Nitekim reperfüzyon sırasında endoteldeki NO sentezinin kısmi olarak inhibe edilmesi mikrodamarlarda peroksinitrit oluşumunu ve KBB hasarını ve dolayısıyla enfarkt hacmini azaltmıştır.

Reperfüzyon sonrası erken dönemde KBB hasarında matriks metalloproteinazlardan (MMP) MMP2 ve MMP9'un önemli rolü olduğu bildirilmiştir (11-13). MMP'ler merkezi sinir sisteminde de bulunan ve ekstraselüler matriks yapılanması, hücre gelişimi, akson yön bulması, inflamatuvar yanıt oluşumu, KBB geçirgenliğinin düzenlenmesi gibi pek çok önemli görevi olan enzimlerdir. Dokuya inaktif zimojen formunda salınırlar ve çeşitli mekanizmalarla aktifleşirler. Daha önce iskemi ve reperfüzyon sırasında oluşan NO'nun MMP aktivasyonunda direkt rol oynadığı öne sürülmüşse de (14), bu mekanizmanın iskemi ve reperfüzyonun erken döneminde MMP aktivasyonundaki temel mekanizma olduğu halen

tartışmalıdır. NO'nun süperoksitle reaksiyona girmesiyle oluşan ve proteinlerle etkileşebildiği bilinen peroksinitrit, MMP aktivasyonuna neden olabilecek potansiyel bir moleküldür. Reperfüzyonun özellikle erken döneminde meydana gelen KBB açılmasından bu mekanizma sorumlu olabilir. Peroksinitrit oluşumunu azaltıcı tedavi yöntemleri ile KBB bütünlüğünün korunması bu hipotezi desteklemektedir.

Bu tez çalışmasında, iskemi ve reperfüzyon sırasında mikrodolaşımda meydana gelen değişikliklerin intravital görüntüleme yöntemleri ile *in vivo* incelenmesi ve izole retina mikrodamarlarında perisit kasılmasını direkt olarak gözlenmesi, ayrıca aynı deneysel düzeneklerde peroksinitritin mikrosirkülasyon ve perisitler üzerindeki etkilerinin araştırılması ve MMP aktivasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

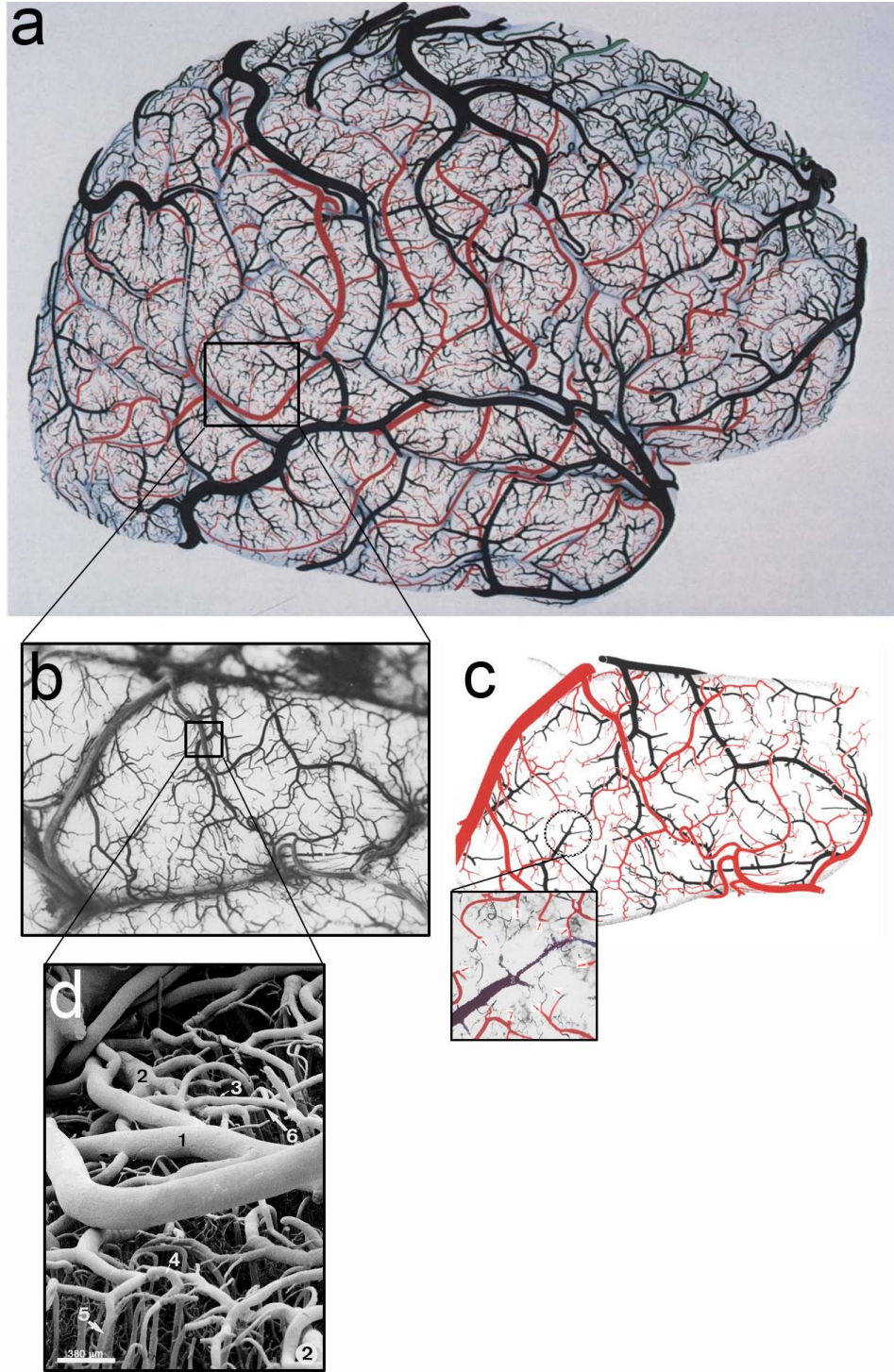
2.1. Serebral Mikrosirkülasyonun Anatomisi

Serebral kan dolaşımı damar büyüklüğüne göre makrodolaşım ve mikrodolaşım olarak ikiye ayrılır. Makrodolaşımın arteriyel safhası boyun arterlerinden başlayarak beynin yüzeyindeki pial arterlere kadar uzanır, venöz safhası ise toplayıcı venleri ve sinüsleri kapsar. Temel işlevi kanın mikrosirkülasyona ve böylece hücrelere ulaştırılmasıdır. Mikrosirkülasyon ise tanım olarak çıplak gözle görülemeyen, 100 μm 'den küçük damarlardaki (pial arterioller, penetran arterioller, terminal arterioller, kalpiller damarlar ve venüller) kan dolaşımıdır. İşlev açısından ise doku perfüzyonunun sağlandığı ve düzenlendiği asıl dolaşım mikrodolaşımdır.

Otopsi serilerinde, pial damarların ve kortikal mikrodamarların anatomisi ayrıntılı olarak çalışılmıştır (15). Bu çalışmalarda, yüzeyel (pial) ve kortikal arterler, venler ve kortikal kapiller ağ ayrı ayrı incelenmiştir.

Pial arterler: Yaklaşık 700 μm çapındaki iletim arterleri sulkuslar boyunca veya bazen de girusları çaprazlayarak hedef lobül ya da girusa ulaşırlar. Buraya ulaştıklarında genellikle girusun ortasına doğru uzanan 260-280 μm çapında bir santral arter dalı verirler. Bu arterlerden 150-200 μm çapındaki birçok dağıtıcı arter dalı çıkar. Her bir dağıtıcı arter yaklaşık 2x3,5 mm'lik bir kortikal yüzey alanına dağılır. Bu arterler birkaç dallanmadan sonra çok sayıda 20-90 μm çapında prekortikal arter dalı verirler. Her bir dal 150-750 μm 'lik bir yolu kat ettikten sonra, 90° açıyla korteks içine giren 30-40 μm çapındaki kortikal penetran arter dallarını verirler (16) (Şekil 2.1).

Pial arterler arasında yaygın bir ağ oluşturacak şekilde çok sayıda leptomeningeal anastomozlar bulunur. İki çeşit anastomoz vardır: Büyük pial arter dalları arasında uç-uca anastomoz sağlayan çapı büyük anastomozlar ve genellikle iki komşu arteri, kortekse penetre oldukları yere yakın yerlerden birleştiren çok küçük çaplı (10 μm) anastomozlar (15). Bu anastomozlar aynı serebral arterin dalları arasında hem de farklı serebral arterlerin dalları arasında bulunurlar. Örneğin, MCA-ACA, MCA-PCA, ve ACA-PCA pial dalları



Şekil 2.1. Pial arter ve venlerin kortikal yüzeydeki seyirleri (a, b, c) ve intrakortikal dallarını verişleri (d) görülmektedir. Kırmızı arterleri, siyah venleri simgelemektedir (Ref.15 ve 17'den değiştirilerek alınmıştır).

arasında leptomeningeal anastomozlar tanımlanmıştır (18). Normal fizyolojik durum için gereğinden fazla olduğu bilinen bu anastomozların tromboembolik vasküler olaylar sırasında kortekse yeterli kan ulaştırılmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir.

Pial Venler: Beyin vasküler anatomisinin diğer dokulardan önemli bir farkı arter ve venlerin yan yana seyretmemeleridir (19). Pial venler genellikle pial arterlerden daha geniş çaplıdırlar. Sıklıkla girusun ortasında merkezi bir büyük ven (280-380 μ m) bulunur. Bazen de sulkuslardaki marjinal venlere dökülen ve birbirine paralel uzanan periferik venler de bulunabilir. Bu büyük venler çapları 130 μ m civarındaki daha küçük dallar verirler. Venler de arterler gibi pial yüzey üzerinde bir ağ oluştururlar ve aralarında anastomozlar bulunur. Ancak arteriyel anastomozların aksine bu anastomozların sayısı girustan girusa farklılık gösterir. Arterlerin ve venlerin kendi aralarında anastomozlar yapmaları ancak beyinde arterio-venöz anastomozların bulunmaması anastomozlarla ilgili önemli bir tespittir (18, 19). Venöz ağ çoğu yerde arteriyel ağın altında yer alır. Ancak yüzeyel venöz ağın aktığı toplayıcı venler büyük serebral venlere katılmadan önce arterlerin üzerinden geçerler. İntrakortikal venler ise düzenli aralıklarla dizilmiş, az sayıdaki geniş çaplı venler ile çok sayıdaki küçük çaplı venler olarak iki ana gruba ayrılırlar. Büyük intrakortikal venler yüzeye hiç çıkmadan direk olarak santral venlere katılabilirler, daha küçük venler ise penetran arterlere benzer şekilde yüzeye çıkararak 90° açı yaparlar.

Yüzeyel damarların yoğunluğu korteksin farklı bölgeleri arasında farklılıklar gösterir (20). Örneğin oksipital lob yüzeyi oldukça yoğun iken hemisferlerin üzerindeki interhemisferik bölgede bu yoğunluk daha azdır.

Kortikal arterler ve dalları: Kortikal penetran arterler ve dalları insan beyninden alınan otopsi materyallerinde ayrıntılı olarak çalışılmıştır. *Korozyon alçı (corrosion cast)* tekniği ile genellikle damar içine kalıp çıkarma amacıyla plastik özellikli bir reçine verilmiş (alçı) ve bu reçine donduktan sonra beyin dokusu KOH solüsyonu içerisinde eritilmiştir (korozyon). Elde edilen damar maketi taramalı elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir

(17, 21). Son yıllarda bu çalışmalara konfokal mikroskop ve mikro BT çalışmaları da eklenmiştir (22, 23).

Bu çalışmaların sonuçlarına göre kortikal arterler penetrasyon derinliklerine göre 3 ana gruba ayrılmaktadır (15) (Şekil 2.2):

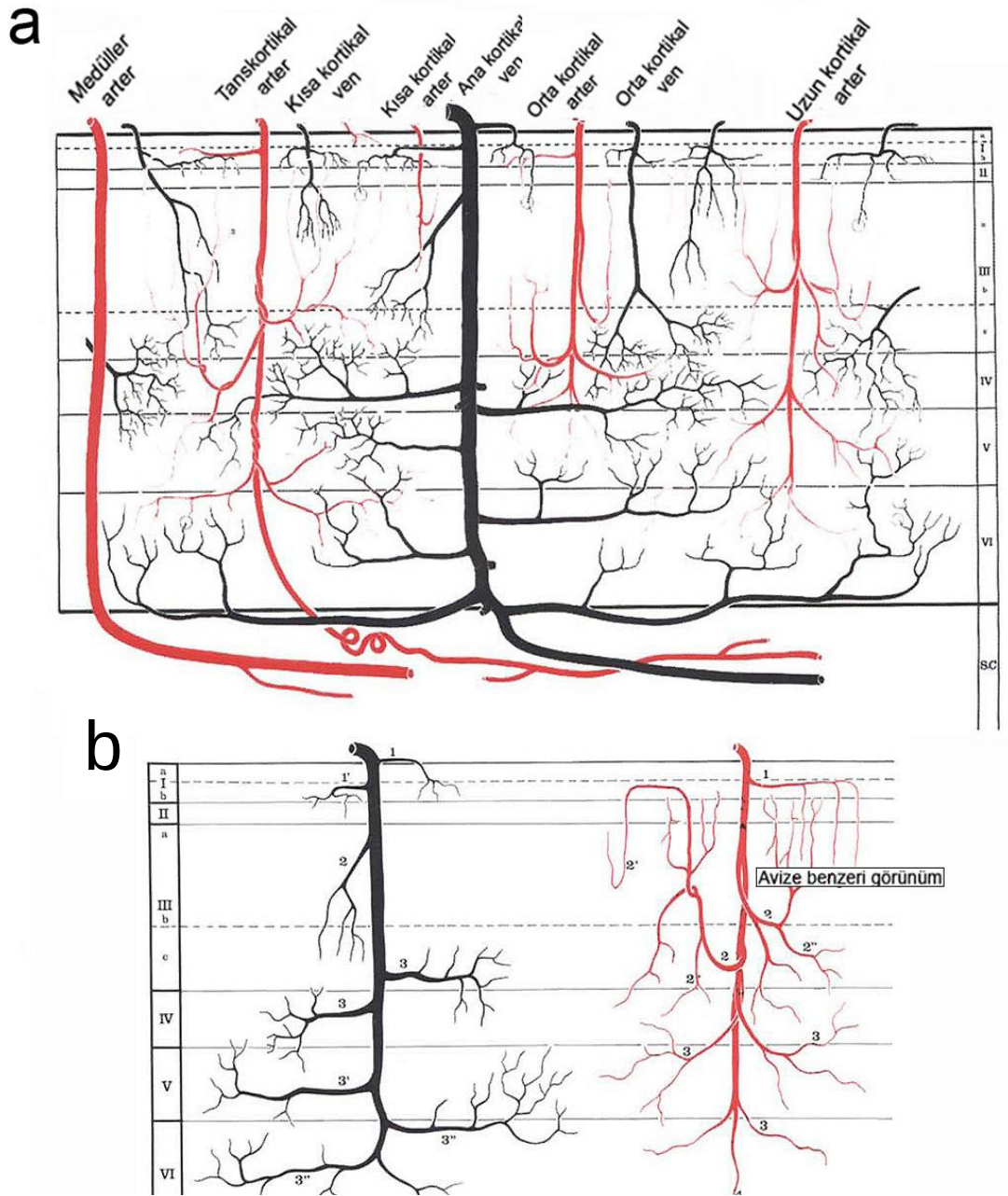
1) Kısa kortikal arterler: Ortalama 20 µm çapında, terminal dallarını 350-800 µm derinlikte veren damarlardır. Penetre olduktan kısa bir mesafe sonra yüzeye paralel uzanan kollateraller verirler. Oblik olarak derine seyreden veya tekrar yüzeye doğru çıkan bazı kollateral dallar da verebilirler. Az sayıdadırlar.

2) Orta kortikal arterler: Ortalama 30 µm çapındadırlar, 1,2 mm derinliğe kadar uzanırlar. 2 çeşit kollateral verirler. Birinci grup ilk segmentten çıkar, yüzeye paralel veya dik seyredebilirler ve kısa kortikal arterlerin terminal dallarıyla aynı seviyede kapillerize olurlar. İkinci grup kollateraller ise daha derinden çıkarak oblik olarak derine doğru seyrederler, korteksin orta bölgesinde kapillerize olurlar. Bu dallar daha sonra tekrar yüzeye dönerek reküran bir seyir de izleyebilirler.

3) Uzun kortikal arterler: Ortalama 65 µm çapında, korteksin en alt tabakasına kadar uzanan damarlardır. 3 çeşit kollateral verirler. Birinci grup yüzeyden 300-500 µm derinlikte çıkar, yüzeye paralel seyreder. İkinci grup korteksin orta bölgesinden çıkar (0,6 – 1 mm derinlikten) ve yukarı doğru dönerek yüzeye doğru seyreder. Bu seyir sırasında birbirine paralel seyreden başka dallar da verebilirler. İkincil kollaterallerin bu tipik görünümü “avize görünümü” olarak da tarif edilmiştir. Üçüncü grup ise en derinde terminal dallara yakın bir yerden çıkar. Bu kollateraller derine doğru seyrederler.

Yukarıdakiler dışında korteksi kat ederek beyaz cevhere ulaşan iki çeşit arter daha bulunur. İlki 30-75 µm çapında, korteks boyunca çeşitli kollateraller verebilen, jukstasubkortikal seviyeye ulaştığında kıvrılarak yüzeye paralel ve zigzag çizerek seyreden bir grup arterdir. Bu damarlara transkortikal arter adı verilmiştir. İkincisi ise beyaz cevhere uzanan ve yalnız orada dallanan arterlerdir. Bu damarlara da medüller arter adı verilmiştir.

Kortikal venler ve dalları: Kortikal venler de arterlere benzer şekilde kısa, orta ve uzun olarak sınıflandırılırlar ancak dallanma biçimi açısından



Şekil 2.2. Kortikal arter ve venlerin uzunluklarına göre çeşitleri (a) ve dallanma seviyeleri (b) görülmektedir (Ref. 15'den değiştirilerek alınmıştır).

daha az karakteristik özellik gösterirler, bu sebeple de tarif edilmeleri daha zordur. Venler arterlerden daha az sayıdadırlar. En önemli ve

karakteristik ven tipi beyaz cevhere kadar uzanan ve oldukça geniş ve uzun olan *korteksin ana venleri* adı verilmiş olan venlerdir. Bu ana venler beyaz cevhere ulaştıkları anda bükülerek düz ve paralel bir seyir gösterirler. Arterlerinkine benzer seviyelerde kollateral dallar verirler ancak belirgin olarak bu kollaterallerin uzunlukları derine inildikçe artar. Bu sebeple bu ana venlerin damarsal hâkimiyet alanı konik bir şekle sahiptir ve tabanı da beyaz cevher komşuluğunda yer alır. Kısa ve uzun kortikal venlerin dallanma paterni irregülerdir ve çalı benzeri bir görünümüleri vardır (Şekil 2.2).

Kortikal kapiller ağ: Kortikal arterlerden çıkan kapiller damarların korteks boyunca yüzeye paralel uzanan derinlemesine dört tabaka oluşturdukları göze çarpar (15, 17) (Şekil 2.3):

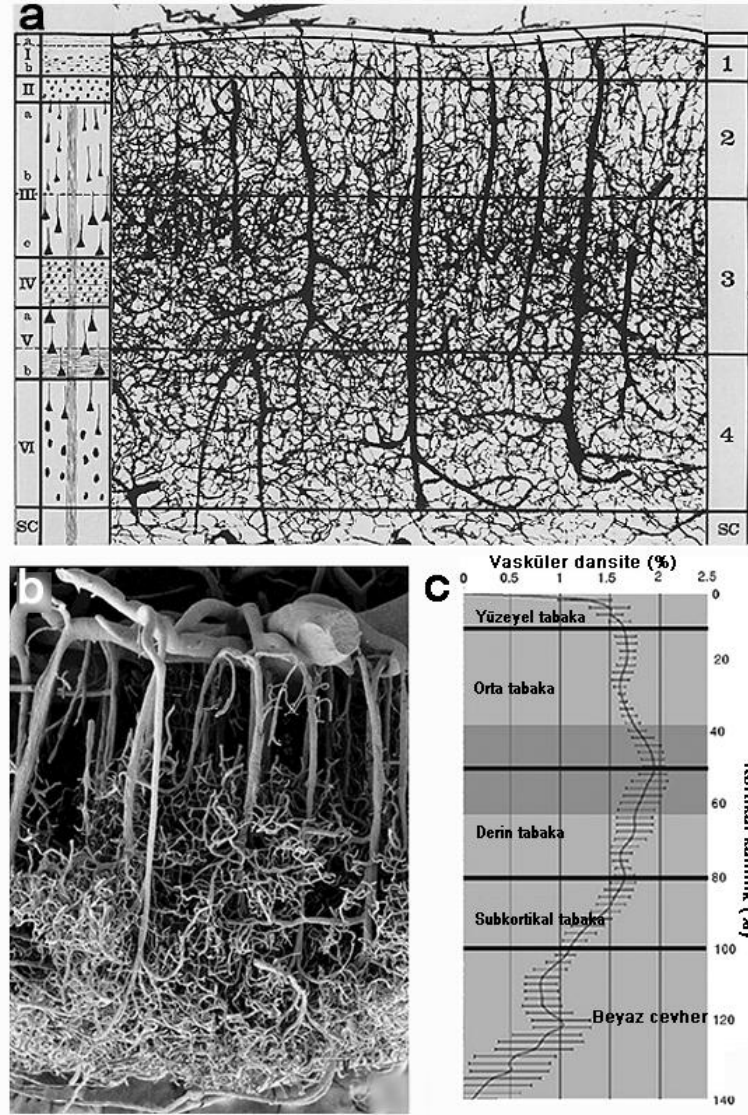
1) **Subpial tabaka:** Yüzeye 250 μm derinlik arasında yer alır (kortikal kalınlığının ilk %10'u). Moleküler tabakanın (tabaka I) içindedir. Üst bölümünde glia limitans yer alır ve hiç kapiller bulunmaz. Alt kısımda ise yüzeye paralel uzanan kapiller bir ağ görülmeye başlar.

2) **Yüzeyel kapiller tabaka:** 250-1150 μm derinlikte bulunur (%10-45 arası), bu aralık Piramidal tabakanın yüzeyel kısmına karşılık gelir (tabaka IIIa ve b). Kısa kortikal arterlerden ve orta kortikal arterlerin primer dallarından çıkan yüzeye paralel uzanan kapiller damarların oluşturduğu bir ağ şeklindedir. Söz konusu arterler arasında yer yer anastomozlar görülür.

3) **Orta kapiller tabaka:** Piramidal tabakanın (tabaka IIIc) alt kısmı, iç granüler tabaka (tabaka IV) ve ganglionik tabaka (Va) boyunca uzanır (1150-2100 μm derinlik, %45-83 arası). En geniş ve vasküler dansitenin en yoğun olduğu kısımdır. Moleküler tabakanın en alt kısmı (tabaka 3c) vasküler yoğunluğun zirve yaptığı kısımdır. Bu yoğunluk hücre sayının fazlalığıyla değil, sinaps sayısının fazlalığıyla ilişkilidir. Bu tabakadaki kapiller damarlar dalgalı seyir gösterirler ve belirli bir yöne uzanmazlar, her yöne gidebilirler. Orta kortikal arterlerin sekonder ve terminal dallarıyla uzun kortikal arterlerin sekonder dallarından çıkan kapiller damarlar tarafından oluşturulmaktadır.

4) **Derin kapiller tabaka:** Tabaka Vb ve VI' ya denk gelir (2100-2500 μm derinlikte, %83-100 arası). Uzun kortikal arterlerin üçüncü seviye kollateralleriyle terminal dallarından çıkan kapiller damarlar tarafından

oluşturulur. Yoğunluk bakımından bir üst tabakaya benzer. Damarlar pial yüzeye paralel uzanır.



Şekil 2.3. Kortikal kapiller ağ tabakalarının kortikal nöronal tabakalarla ilişkisi (a, b) ve yoğunluk dağılımı (c) görülmektedir (Ref. 15, 17 ve 24'ten değiştirilerek alınmıştır).

Intrakortikal arter ve venlerin yerleşimi: İntrakortikal arter ve venlerin yerleşimi belirli bir düzen gösterir. Merkezi bir venin etrafında hegzagonal yerleşimli çok sayıda intrakortikal arterin varlığı sıçanlarda gösterilmiştir (25). Bu hegzagonların genişliği merkezde yer alan venin

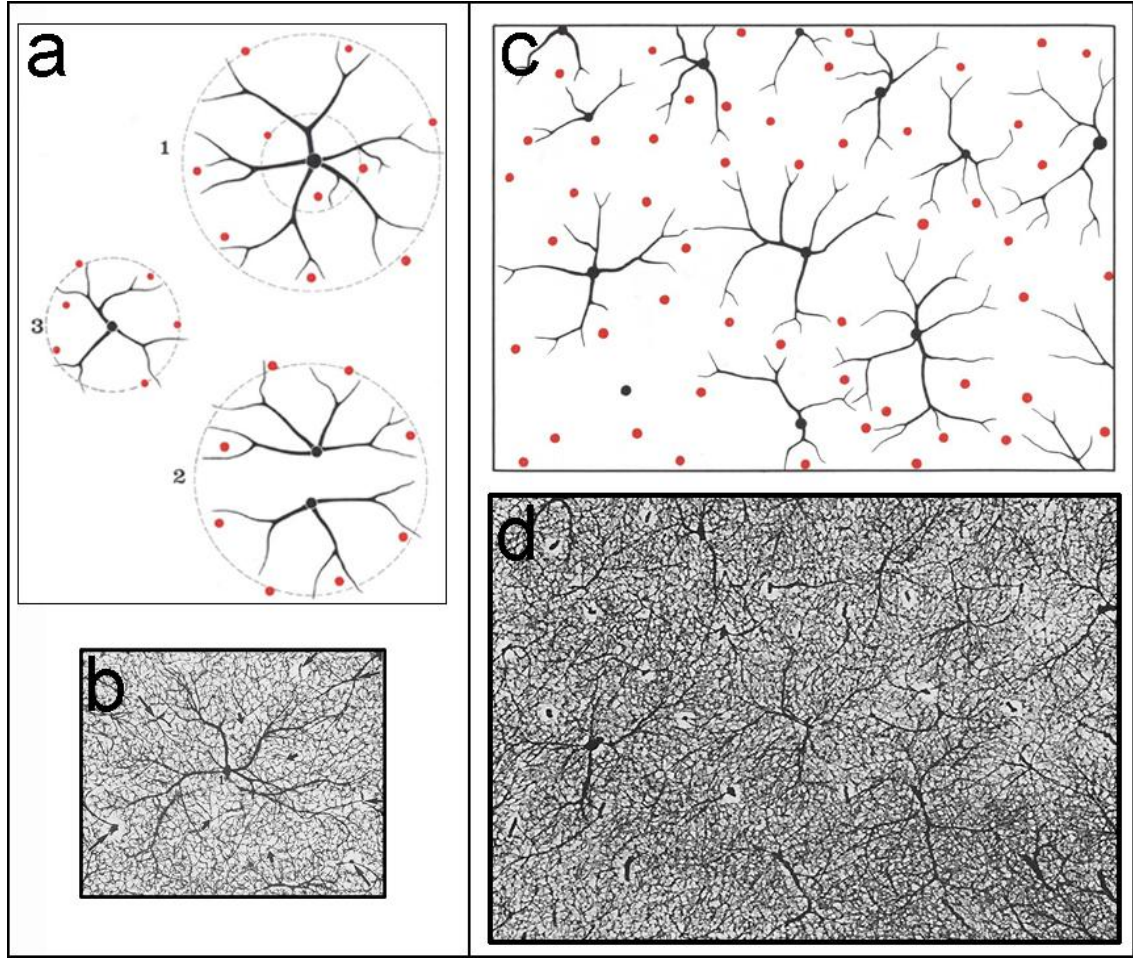
çapıyla doğru orantılıdır. Benzer bir yerleşim insanlarda da mevcuttur (23). Merkezde bulunan bir ana kortikal venin veya birden fazla daha küçük venin etrafında halka şeklinde kortikal arterler dizilir. Merkezdeki ven büyükse etrafında birden fazla konsentrik halka bulunabilir. Bazen de iki ana ven yan yana bulunurlar. Kortikal arterlerin sayısının venlere oranla dört kat fazla olmasının nedeni bu dizilimdir. Merkezdeki ven orta büyüklükte ise etrafındaki alan 0,75-1 mm'dir, ana ven etrafındaki halka ise 1-4 mm arasında değişir (15) (Şekil 2.4).

Kortikal vasküler ağ homojen değildir. Daha önce bahsedilen paralel tabakalar arası değişkenliklerden başka farklılıklar da mevcuttur. Örneğin, korteksin duyusal ve asosiyatif bölgeleri motor bölgelere oranla daha yoğun bir vaskülarizasyon gösterirler. Ayrıca vertikal olarak da heterojeniteden söz edilebilir. Bütün kortikal arter ve venlerin etrafında kapiller damarsız bir alan bulunur. Bu alan ilk olarak Pfeifer tarafından tariflenmiştir (15). Bu *Pfeifer boşluğunun* etrafındaki kapiller ağ yoğunlaşarak kortikal damarın etrafında adeta bir tünel oluşturur. Bu tünelin çapı merkezdeki arterin çapına bağlıdır. 75 µm'lik bir damarın etrafında 225 µm'ye ulaşabilirken, 40 µm'lik bir damarın etrafında 170 µm civarındadır. Bu boşluk ikincil dalların etrafında oldukça azalarak yok olur ve arterlerin etrafında venlere göre daha belirgindir.

Kortikal damarlar arasındaki anastomozlar: Uzun süre her bir kortikal arterin diğer arterlerden izole bir uç birim olduğu düşünülmüştür. Ancak TEM çalışmalarında arter-arter ve kapiller anastomozların varlığı gösterilmiştir. Diğer organlarda var olan ancak beyindeki varlığı tartışma konusu olan arterio-venöz anastomozlara ise bu çalışmalarda rastlanmamıştır (26).

Kapiller ağ anastomozlar ile birlikte bütün korteks bölgelerine yayılır. Teorik olarak bir eritrosit oksipital lobdaki bir kapillerden bu ağ yoluyla frontal lobdaki bir kapillere ulaşabilir (18). Deneyler, tromboembolik serebrovasküler olay esnasında bu anastomozların azalan kan akımını arttırmakta bir dereceye kadar etkili olduklarını göstermiştir (27).

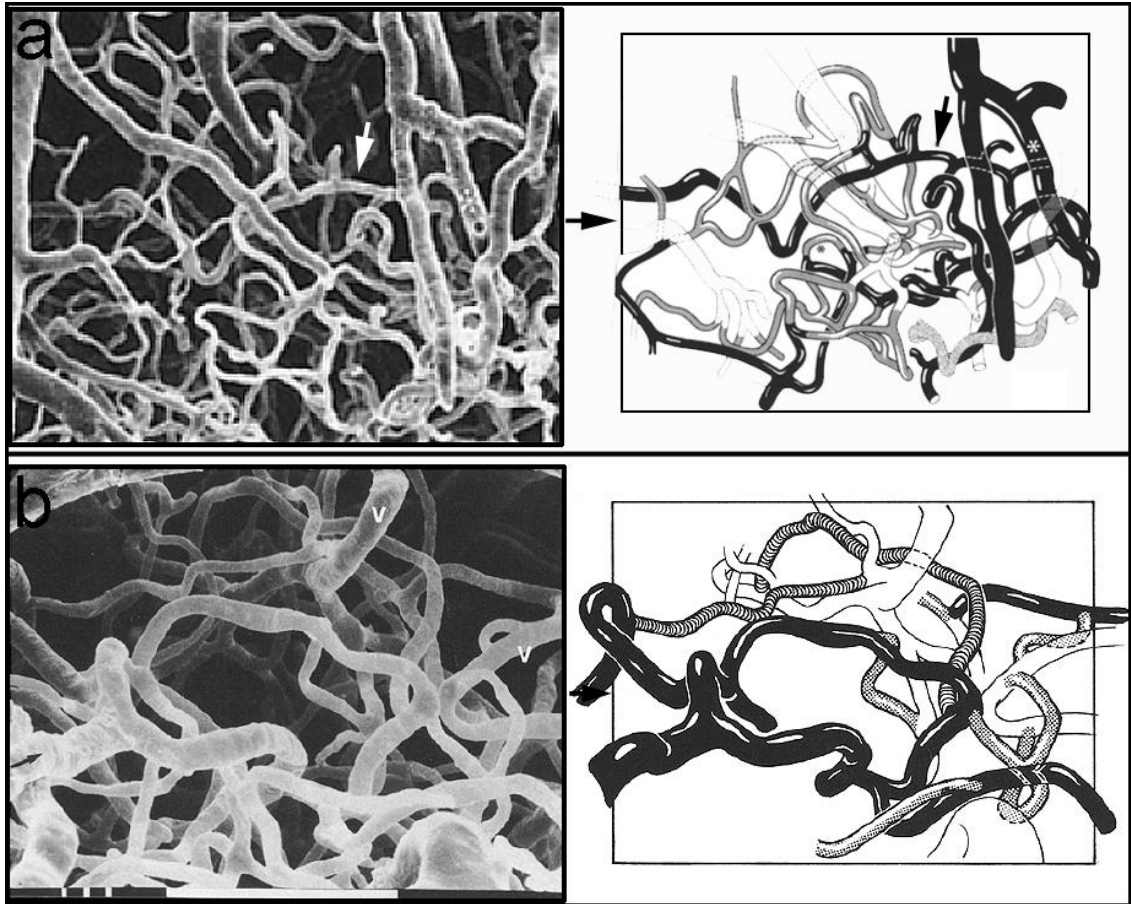
Arteriyel anastomozlar prekapiller metarteriyoller arasında yer alırlar ve 12-17 µm çapındadırlar (Şekil 2.5a). Venöz anastomozlara beyinde hiç rastlanılmamıştır (15).



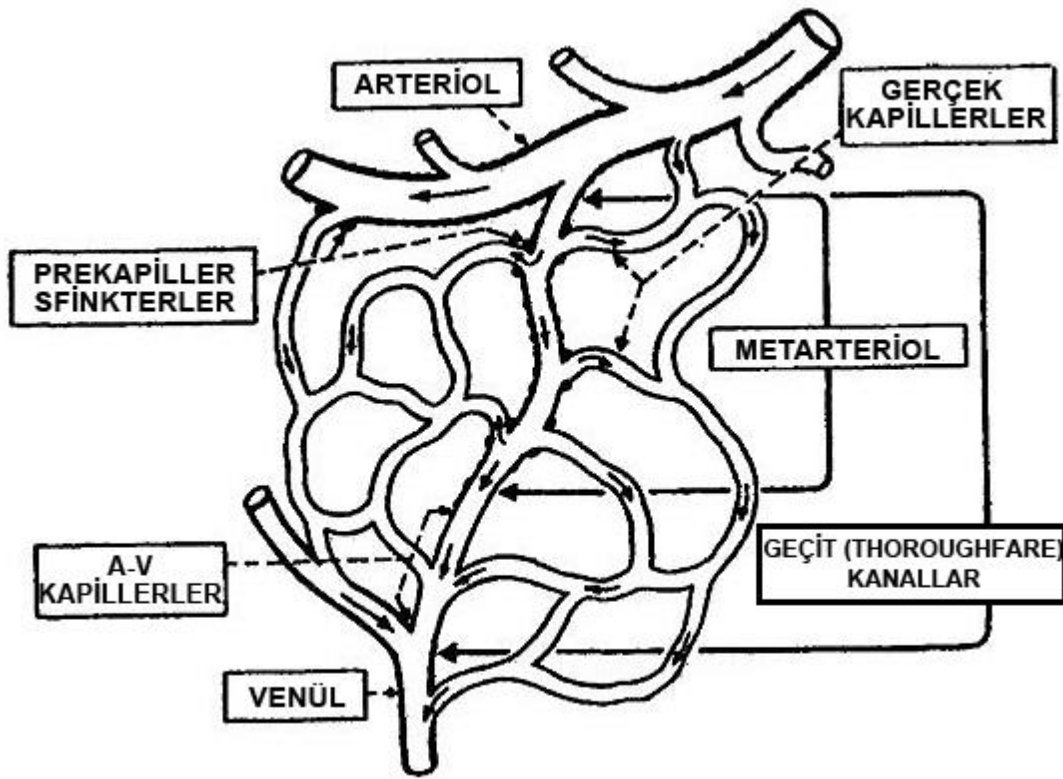
Şekil 2.4. İntrakortikal arterlerin venler etrafındaki hekzagonal yerleşimi (a, b, c, d). Pfeifer boşluğu arterlerin etrafında seçilebilmektedir (d) (Ref. 15'den değiştirilerek alınmıştır).

Büyük arterio-venöz anastomozlar nadiren tariflenmiş olsa da bu tariflerin gerçekten anastomoz mu oldukları yoksa bitişik seyreden iki damar oldukları tartışmalıdır. Arterio-venöz anastomozlarla ilgili literatürdeki asıl tartışma konusu ise küçük prekapiller arteriolo-venöz şantların (veya anastomozların) varlığı ve olası işlevleridir. Bu tartışmanın kökeni Chambers ve Zweifach'ın diğer organlarda yapmış oldukları klasikleşmiş çalışmaya dayanmaktadır. Bu çalışmada prekapiller arterioller ve postkapiller venüller arasında *geçit kanalların* (*thoroughfare* veya *preferential channels*) bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6). Bu kanallardan çok sayıda kapiller çıkar

ve bu kapiller damarların orijininde sfinkterler bulunur (28). Metabolik ihtiyaç az olduğunda bu sfinkterler kasılarak kanın arteriyolden doğrudan venüle geçmesini sağlarlar. Bu geçit kanallarının varlığını göstermek zordur. Çünkü bir kapillerin çapı yaklaşık 6 μm iken, bu anastomozların çapı da yaklaşık 8 μm 'dur. Ancak damar duvarının histolojik incelemesiyle kesin bir ayırım yapılabilir. Yine de pek çok araştırmacı bu anastomozların beyinde var olduğunu düşünmektedir (Şekil 2.5b).



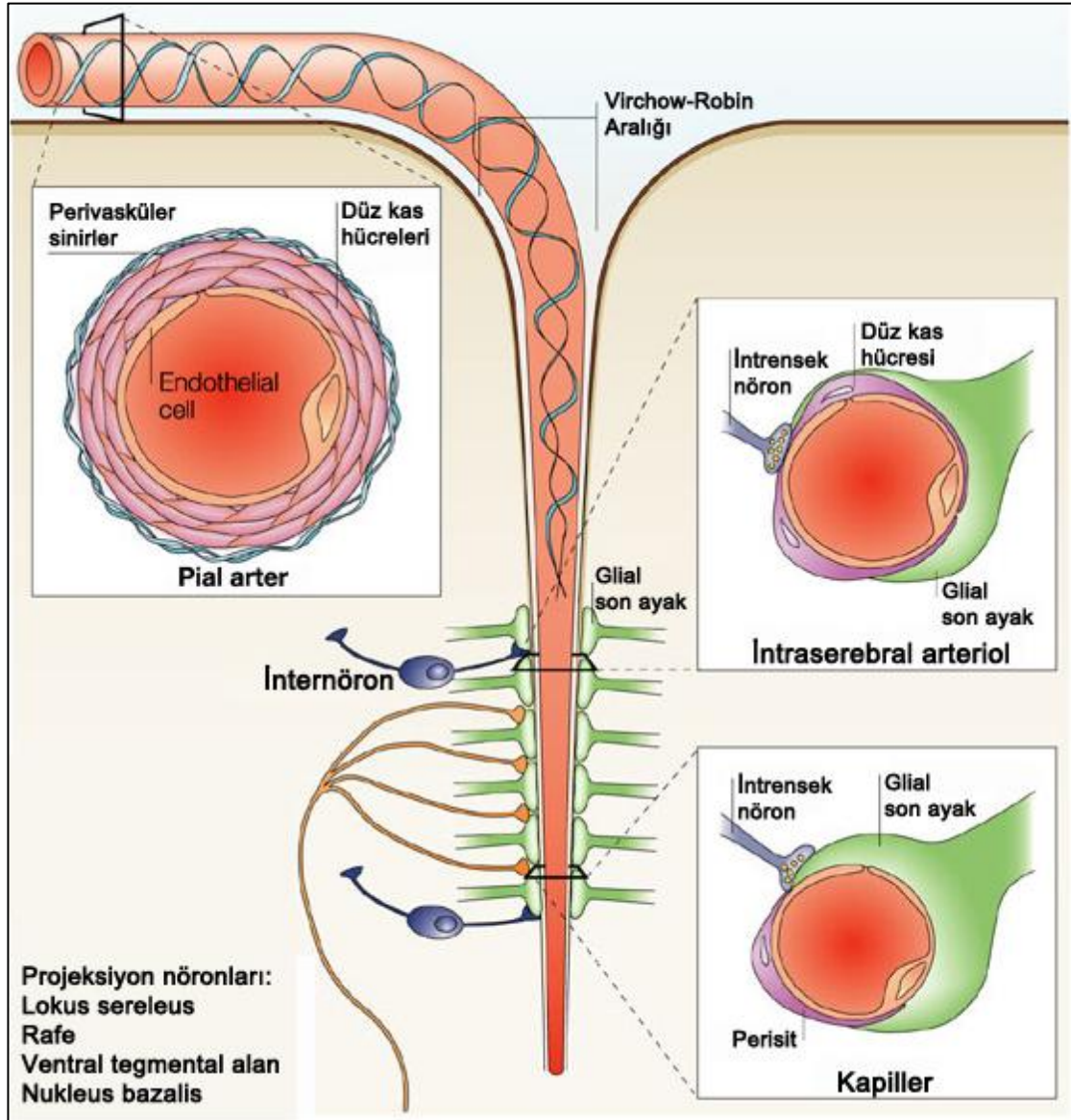
Şekil 2.5. Üst panelde arterden artere anastomoz görülmektedir. Alt panelde, bir prekapiller arteriolo-venöz şant gösterilmektedir, gri renkle gösterilen damar standart bir kapillerden uzundur ve arterden çıkarak doğrudan vene girmektedir. Sağdaki resimler soldaki orijinal fotoğrafların temsili çizimidir (Ref. 26'dan değiştirilerek alınmıştır).



Şekil 2.6. Geçit kanalı (*thoroughfare channel*) görülmektedir. Zweifach'ın çalışmasından alınmıştır (Ref. 29'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.2. Serebral Mikrosirkülasyonun Histolojisi

Pial damarlar subaraknoid aralıkta genelde etrafları beyin omurilik sıvısı (BOS) ile çevrili olarak ya da bazen pia mater ile ve glia limitans ile temas halinde ve/veya onlar tarafından bir miktar sarılı halde bulunurlar. Pial damarlardan korteksin derinliklerine uzanan penetran arterioller çıkar. Bu damarlar ilk başta subaraknoid aralığın korteks içine uzantılarını teşkil eden Virchow-Robin aralığında seyrederek ancak daha sonra bu aralık kaybolmaya başlar ve arteriollerin etrafını önce kısmen daha derine inildikçe ise tamamen astrosit son ayakları sarar. Böylece arteriol intraserebral hale gelir (30) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mikrodamar kesitlerinde histolojik yapı görülmektedir (Ref. 30'dan değiştirilerek alınmıştır).

Serebral arterlerin diğer dokulardaki arterlerden önemli bir farkı vasa vasorumlarının olmayışıdır. Bu damarlar BOS'tan difüzyonla beslenirler, böylece sistemik hipotansiyona daha dirençli olurlar. İleri yaşta büyük arterlerin etrafında vasa vasorum gözlemlendiği bildirilmiştir. Bir diğer farklılık serebral arterlerin etrafındaki elastik tabakanın tek bir tabaka halinde bulunmasıdır (19). Serebral kapillerler ise diğer kapiller damarlardan daha irregüler ve kıvrımlı bir yapıya sahiptir (31).

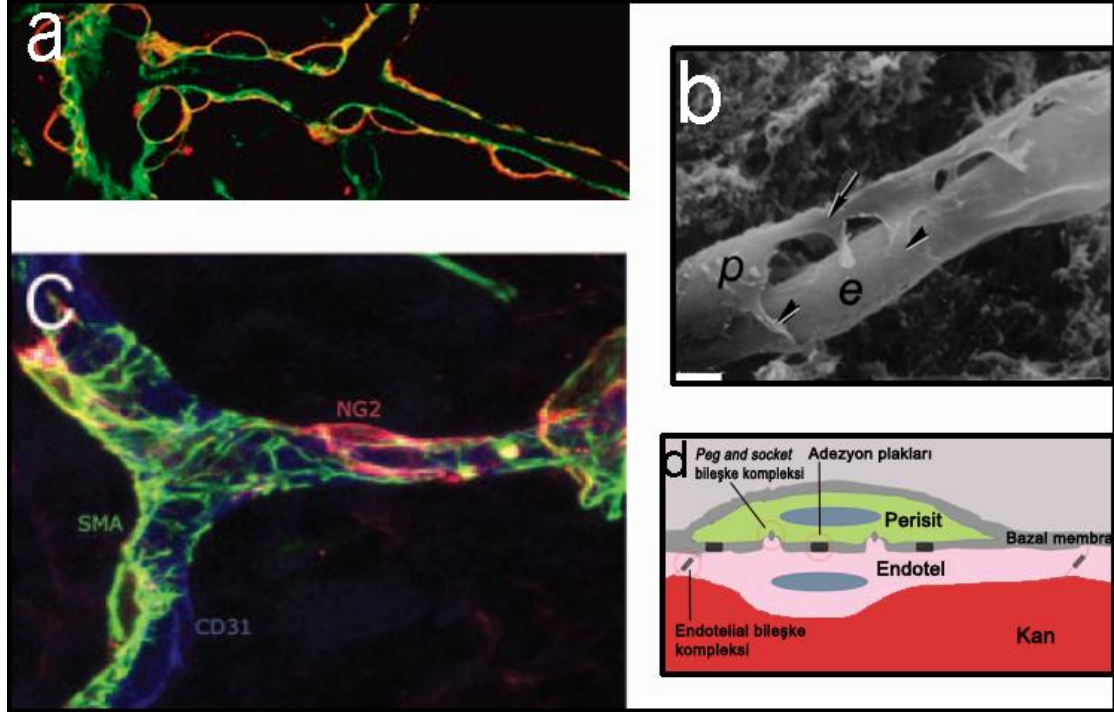
2.2.1. Perisitler

Perisitler daha çok kapillerlerin ve postkapiller venüllerin, az miktarda da arteriollerin etrafında bazal membrana gömülü halde bulunan mezankimal kökenli hücrelerdir. İlk kez 19. yüzyılda Charles Rouget tarafından tarif edilmişlerdir ve uzun süre Rouget hücreleri ve mural hücreler olarak adlandırılmışlardır. Perisit ismi ise ilk kez 1923 yılında Zimmerman tarafından kullanılmıştır (32). Vücutta bütün dokularda değişik oranlarda bulunurlar, en çok santral sinir sistemi ve retinada bulunurlar. Perisit/endotel hücre oranı retinada 1:3, beyinde 1:5, akciğerde 1:10, iskelet kasında 1:100 oranında bulunur (33). Karaciğerde Ito hücresi, böbrekte mezenjial hücre adı verilen bu hücrelerin değişik dokularda farklı işlevleri vardır.

Perisit hücre gövdesi, belirgin bir çekirdek ve etrafındaki az miktardaki sitoplazmadan oluşur. Hücre gövdesinden damara paralel birincil uzantılar çıkar. Bu uzantılar özellikle bifurkasyon bölgelerinde birden fazla kapillere ulaşabilirler (34). Bu uzantılardan damarı çepeçevre saran küçük ikincil uzantılar çıkar. Perisitler beyindeki kapiller damarların çevresinin %22-32'sini kaplarlar (35). Perisitlerle endotel hücreleri arasında direkt temas noktaları bulunmaktadır. Bu noktalarda iki hücre arasında bazal membran bulunmaz. İki çeşit temas şekli vardır. *Yapışkan plaklar (adezyon plakları)* fibronektinden oluşur ve iki hücrenin birbirine tutunmasını sağlarlar. Çivi-soket (*peg and socket*) bağlantılar ise iki hücreden birinin ötekine içine doğru çivi benzeri uzantılar göndermesi ile oluşur (36). Bu uzantılar içerisinde sıkı, boşluklu (*gap*) veya yapışkan kavşaklar bulunabilir (Şekil 2.8). Boşluklu kavşaklar iki endotel hücresi arasında ve endotel ile perisit arasında bulunurlar ancak vasküler düz kas hücrelerinin aksine iki perisit arasında bulunmazlar (37).

Perisitlere özgü bir işaretleyici henüz bulunamamıştır. Ancak perisitleri diğer hücrelerden, özellikle de endotellerden ve düz kas hücrelerinden ayırma da çeşitli antikolar kullanılmaktadır. Anti-NG2 (kondroitin sülfat proteoglikan) ve anti-SMA (anti-düz kas aktini) en sık kullanılan iki antikordur. NG2 hücre yüzeyindeki bir proteoglikandır (38). Ayrıca dezmin, trombosit-

kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR- β) ve aminopeptidaz A ve N de bu amaçla kullanılmaktadır (39).



Şekil 2.8. Mikrodamarların etrafındaki yumru şekilli perisitler ve uzantıları (a, b, c); endotel hücreleri ve perisitler arasındaki bağlantılar (d) görülmektedir (Ref. 7, 36 ve 40'dan değiştirilerek alınmıştır).

Perisitler morfolojik olarak lizozom miktarının fazlalığına göre granüler ve agranüler olarak ikiye ayrılabilir. Serebral perisitler genellikle granülerdir ve lizozomların içinde de bol miktarda asit fosfataz mevcuttur. Kan beyin bariyeri deneysel olarak bozulduğunda lizozomların sayısının arttığı gözlenmiştir (41). Bu bulgular perisitlerin aktif olarak fagositoz yaptığını destekler niteliktedir. Perisitler ayrıca bol miktarda vezikül de bulundurlar. Bu veziküllerin yalnız %10'u endotel tarafındadır, geri kalanı abluminal tarafta yer alır. İntravenöz enjeksiyonu takiben bir işaretleyici boya olan yaban turpu peroksidazını (*horse radish peroxidase*, HRP) perisitlerin bol miktarda fagosite ettikleri tespit edilmiştir.

Perisitlerin kasılma özelliğine sahip olup olmadıkları bir dönem tartışma konusu olmuşsa da in vitro çalışmalarda bu özelliğe sahip oldukları

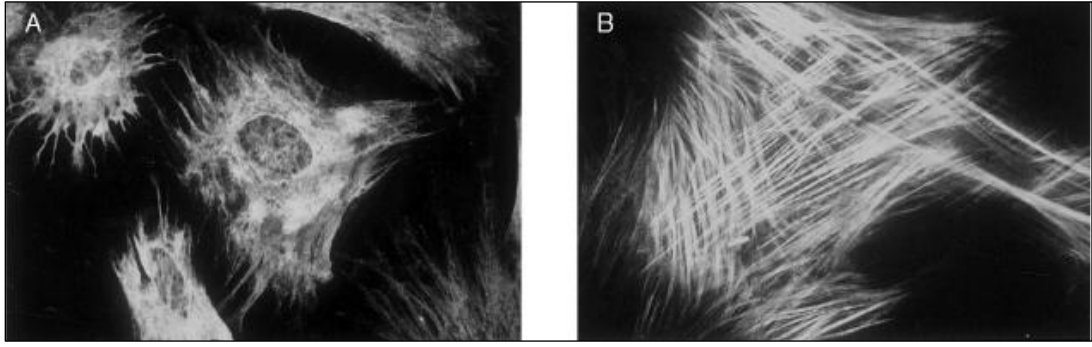
kesin bir biçimde gösterilmiştir (7, 42). Perisitlerin vasküler düz kas hücrelerine benzer bir şekilde kontraksiyonda görevli pek çok proteini sentezledikleri bilinmektedir (43). Aşağıdaki tabloda bu proteinler gösterilmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Beyin ve retinadaki perisit ve düz kas hücrelerindeki kasılma özelliğine sahip proteinlerin karşılaştırılması (Ref. 43'den alınmıştır).

İşaretleyiciler:	Beyin		Retina	
	Düz kas	Perisit	Düz kas	Perisit
α -SM aktin	+	+	+	+
SM myozin	+	-	+	-
β -aktin	+	+	+	+
NM myozin	+	+	+	+
Vimentin	+	+	+	+
Kalponin	+	-	+	-
Dezmin	+	-	+	-
ISKELET/SM myozin	+	-	+	-

Perisitler üzerinde kontraksiyona aracılık eden kolinerjik ve α -2 adrenerjik, dilatasyona sebep olan β -2 adrenerjik reseptörler bulunur. Ayrıca endotelin-1 reseptörleri de bu hücrelerin endotelden salınan endoteline cevaben kasılmalarını sağlarlar (44). Perisitlerin hiperoksiyi ve yüksek CO_2 seviyelerini algılayarak kasılıp gevşeyebildikleri de gösterilmiştir. Endotel hücrelerinin sentezlediği nitrik oksit, vasküler düz kas hücreleri gibi perisitlerin de gevşemesini sağlayabilmektedir (45). Ayrıca yine endotel kaynaklı PGI_2 (prostoglandin I2) perisitlerin gevşemesine sebep olurken PGH_2 (prostoglandin H2) ve tromboksan A_2 'de kasılmalarını sağlar. Kasılma sinyalinin alınmasını takiben (örneğin endotelin uygulaması ile) perisit sitoplazmasında dağınık halde bulunan aktin mikofilamanları reorganize olarak düzenli bir görünüm alırlar (Şekil 2.9).

KBB oluşumunda ve idamesinde endotel hücreleriyle perisitler sıkı bir ilişki içinde olmaları gereklidir. KBB oluşumundan temel olarak astrositlerin sorumlu olduğu öne sürülmüşse de, astrositlerin hasarlandığı deneysel



Şekil 2.9. Endotelin uygulamasını takiben perisit sitoplazmasında dağınık halde bulunan (A) aktin mikofilamanlarının reorganize oldukları (B) görülmektedir (Ref. 37'den alınmıştır).

durumlarda endotel hücreleri sıkı kavşak proteinlerini sentezleyebilme gibi KBB özelliklerini devam ettirebilmişlerdir. Perisit kaybının görüldüğü trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ifade etmeyen farelerde mikrodamarlarda çok sayıda mikroanevrizma oluşumu gözlenmiştir (46). Endotel hücreleri arasındaki sıkı kavşakların oluşumunda üzerlerinin perisit uzantılarıyla çevrenmesinin etkili olduğu gösterilmiştir (33). Perisit-endotel bağlantılarının endotel hücrelerinin etkin bir bariyer oluşturabilmesinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Perisitlerin endotel hücrelerini aşmayı başaraabilmiş moleküllere karşı ikinci bir savunma hattı oluşturduğu da öne sürülmüştür (47). Ödem ve protein ekstravazasyonu durumlarında perisitlerin aktif olarak pinositoz yaptıkları gösterilmiştir (33). Ayrıca bu hücrelerin δ -glutamiltranspeptidaz (48), glutamil aminopeptidaz, aminopeptidaz *N* (49), glutamik asit dekarboksilaz ve butirilkolinesteraz eksprese ediyor olmaları da bu hücrelerin metabolik kan beyin bariyerinde de rol aldıklarını göstermektedir.

Perisitler anjiojenezde de etkili rol oynamaktadırlar. Anjiojenik uyaran varlığında perisitler bazal membranı yıkarak mikrodamarın dışına çıkarlar. Endotel hücrelerine kılavuzluk ederek çoğalmalarına ve bağlantılar oluşturmalarına yardım ederler. Bu işlevlerin gerçekleştirilmesine dönüştürücü büyüme faktörü β -1 (TGF β -1) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aracılık eder. Perisitlerin çoğalması da PDGF, fibroblast

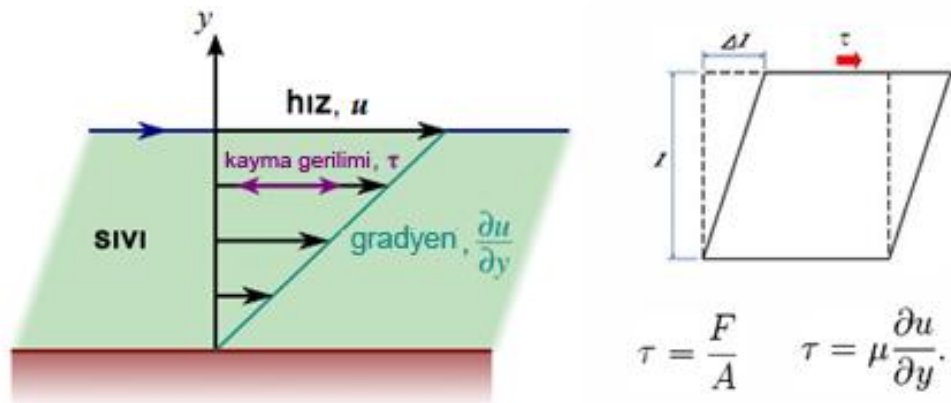
büyüme faktörü (FGF) ve endotelin-1 ile sağlanır. Anjiogenezin bitimiyle birlikte perisitler yeni oluşan damarların etrafına yerleşerek yeniden bazal membran sentezlemeye başlarlar.

Perisitlerin ayrıca makrofaj gibi fagositik hücrelere ve diğer dokularda da adiposit, osteoblast gibi hücrelere dönüşme potansiyeli de vardır (45).

2.3. Mikrovasküler Reoloji ve Hemodinami

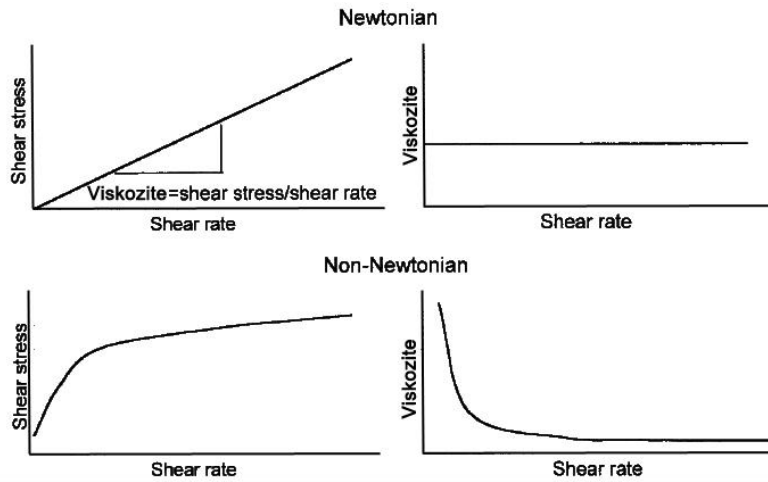
Kan iki fazdan (hücresel elemanlar ve plazma) oluşan bir akışkandır ve makrodolaşım ile mikrodolaşımdaki davranışları bazı fizik kurallarıyla açıklanabilir. Reoloji akışkanların davranışlarını inceleyen bilim dalıdır, diğer adıyla viskozite bilimidir (29).

Sıvıların akmaya karşı gösterdiği iç dirence viskozite adı verilir, η veya μ ile simgelenir. Viskozite akışkanlığın tersidir. Viskozite arttıkça akışkanlık azalır. Genellikle herhangi maddenin akışı esnasında akışkanın tabakaları farklı hızlarda hareket ederler. Buna laminar akım denir. Akışkanın viskozitesi, uygulanan kuvvete karşı direnç gösteren tabakalar arasındaki yüzey gerilimlerinden dolayı ortaya çıkar. Isaac Newton'un öne sürdüğü üzere, laminar ve paralel bir akışta, tabakalar arasındaki kayma gerilimi (*shear stress*, τ) bu tabakalara dik yöndeki hız gradyeni ($\partial u / \partial y$) ile orantılıdır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Tabakalar arası kayma gerilimi (Ref. 50'den değiştirilerek alınmıştır).

Buradaki gerilim, formülden de anlaşılacağı üzere yüzeye paralel yöndeki basınçtır, diğer bir deyişle birim alana düşen kuvvettir. Buradaki μ sabiti, viskozite sabiti, viskozite veya dinamik viskozite olarak bilinir. Bu formül kullanılarak sıvıların viskoziteleri viskometre adı verilen bir aygıtla ölçülür. Bu formüle göre kayma gerilimi ile hız gradyeni arasındaki lineer ilişki vardır bir akışkanın viskozite değeri sabit bir değerdir. Böyle sıvılara *Newtonian* sıvılar denir Örneğin, su, plazma böyle sıvılardır. Ancak böyle olmayan sıvılar da vardır. Kanın da aralarında bulunduğu böyle sıvılara *Newtonian* olmayan sıvılar adı verilir. Aşağıdaki grafikte görüldüğü (Şekil 2.11) gibi artan kayma gerilimi viskositenin azalmasına sebep olursa buna kayma incelmesi (*shear thinning*) denir. Kan da böyle bir sıvıdır (51). Bu durumun sebepleri aşağıda tartışılacaktır.



Şekil 2.11. *Newtonian* ve *Newtonian* olmayan sıvılarda viskozite (Ref. 52'den değiştirilerek alınmıştır).

Laminar, üniform ve viskoz bir sıvının, sabit kesit alanına sahip silindirik bir tüp içindeki akışı Poiseuille adlı Fransız bilim adamının 1840 yılında bulduğu bir denklemle tarif edilmektedir (29):

$$Q = \frac{\Delta p}{L} \frac{\pi d^4}{128\mu}$$

Bu formülde Q akımı (ml/sn), d çapı, l uzunluğu, ΔP , basınç farkını ve μ 'de viskoziteyi göstermektedir. Bu formül sayesinde kapiller bir tüp içerisinde akan bir sıvının akımı ve basınç farkı ölçülerek viskozitesi hesaplanabilir. Viskozite birimi olarak kullanılan santipoiz (cP, =milipaskal.sn) Poiseuille'ye atfen kullanılmaktadır. 20°C'deki suyun viskozitesi 1 cP kabul edilir. 37°C'deki kanın ise 6cP civarında kabul edilir. Bu formül hem makro hem de mikrodamarlardaki kan akımının hesaplanmasında önemlidir. Akımın temel formülü $F=P/R$ (akım=basınç/direnç) Poiseuille formülüyle birlikte düşünüldüğünde iki özellik ön plana çıkar:

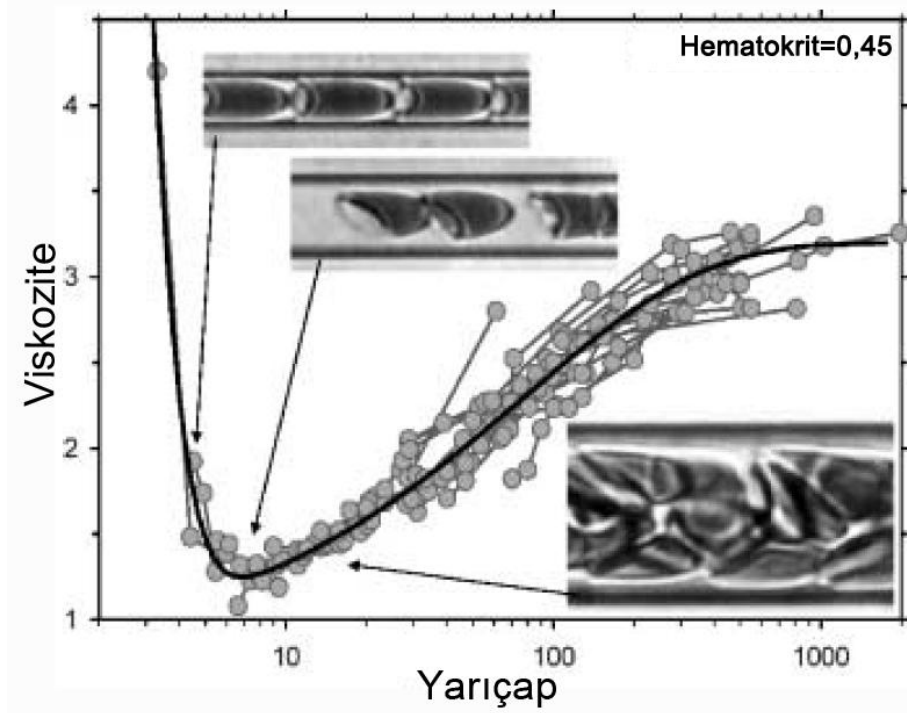
1) Damar çapının 2 katına çıkması akımın 16 katına çıkmasına sebep olur.

2) Damar çapı haricinde direnci ve sonuçta akımı belirleyen ikinci değişken viskozitedir. Yani kanın reolojik özellikleri önemlidir.

Fåhræus adlı İsveçli bilim adamının 1930'larda insan kanını 40-505 μm arasındaki kapiller tüplerden geçirerek yaptığı deneyler kanın viskozitesiyle ilgili önemli bilgiler sağlamıştır (53). Buna göre kanın içinde aktığı tüpün çapı küçüldükçe viskozitesi de küçülür. Bu küçülme 5-7 μm çapa kadar devam eder Bu uzunluk kapiller damarların çapına eşittir. Bu noktadan sonra tekrar dik bir artış meydana gelir (Şekil 2.12). Bu etkiye Fåhræus-Lindqvist etkisi denir.

Bu azalmanın sebebi kapiller damarlarda eritrositlerin tek sıra halinde akması ve endotel ile aralarında kayma geriliminin normalde en fazla olduğu yerde kayganlaştırıcı etki yapan plazma tabakasının bulunmasıdır (54). Biraz daha büyük damarlarda ise çok sıralı akım görülür. Bu da tabakalar arası sürtünme kuvveti nedeniyle viskozitenin artmasına neden olur. Bu noktada mikro ve makrodolaşım arasındaki farkla ilgili şöyle bir örnek verilebilir: 6 μm 'lik bir damarda plazma yerine hematokriti 0,45 olan kanın akması %30'luk viskozite farkı yaratırken, aynı fark 1000 μm 'luk bir damarda %220 olacaktır (53).

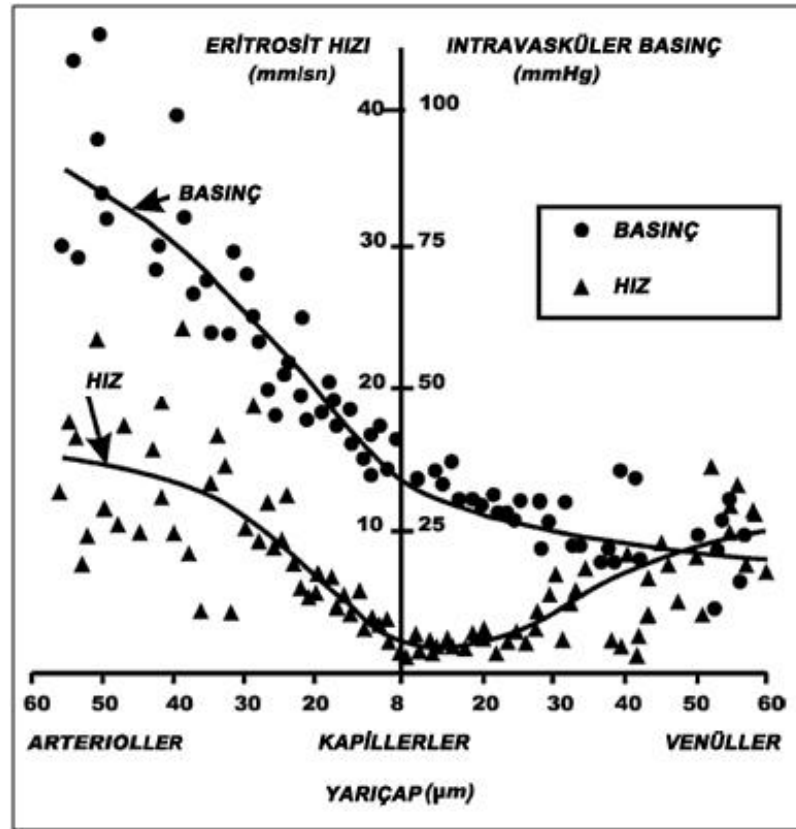
1960'lardaki çalışmalarında Zweifach ve arkadaşları kedi mezenter yatağında kan basıncı ve akım hızı ölçümleri yapmışlardır (29). Buna göre damar yatağı boyunca kan basıncının %80'i mikrovasküler yatakta düşer. En



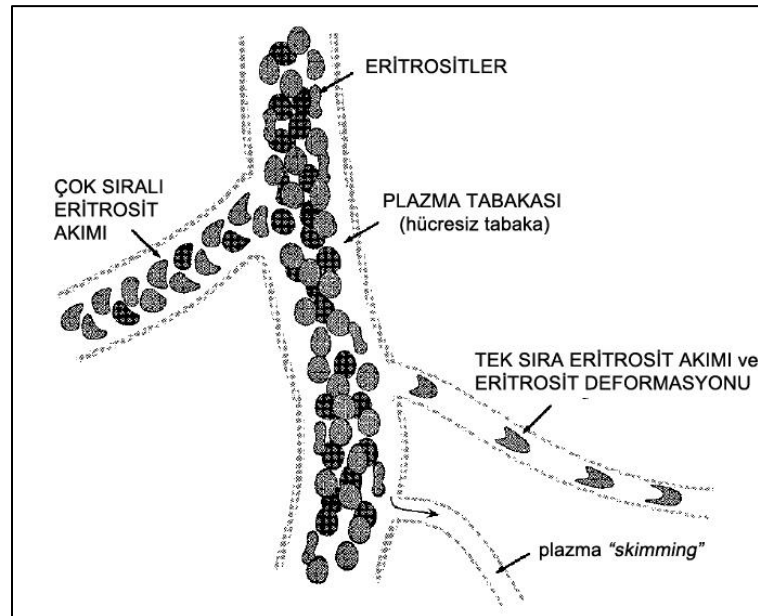
Şekil 2.12. Damar çapı-viskozite ilişkisi (Ref. 53'ten değiştirilerek alınmıştır).

hızlı düşüş prekapiller arteriollerde meydana gelir. En düşük hız ise kapiller yatakta görülür (Şekil 2.13).

Mikrosirkülasyonun önemli bir özelliği heterojen olmasıdır. Bu heterojenlik hematokrit başta olmak üzere akım ve eritrosit hızı, oksijen parsiyel basıncı gibi diğer parametreleri de içerir. Dallanma noktalarında oluşan bu farklılığa faz-ayırımı (*phase-separation*) denir. Bu ayrımı dalların her birinin çapı ve dallanma açısı ve içlerindeki akım miktarı belirler. Genel olarak daha fazla akım alan damarların hematokriti de daha yüksek olur. Hatta kimi dallarda yalnızca plazma bulunabilir (*plasma skimming*) (Şekil 2.14). Hematokritteki bu heterojenliğin varyasyon katsayısı bir çalışmada 0,60 olarak bulunmuştur (54).



Şekil 2.13. Kan basıncı ve akım hızının damarsal yatakta dağılımı (Ref. 29'dan değiştirilerek alınmıştır).

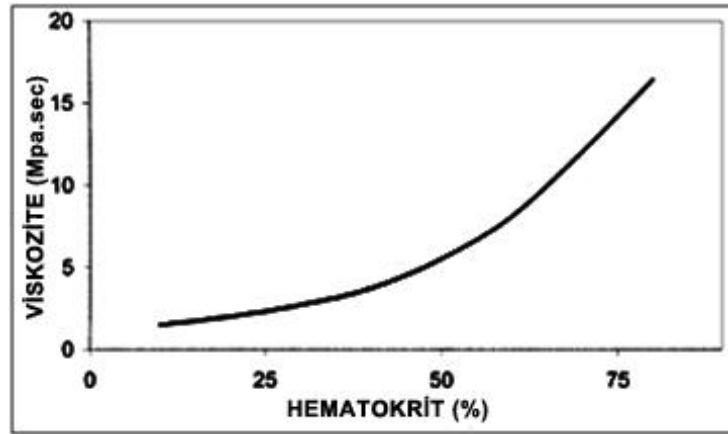


Şekil 2.14. Faz ayrımı ve plazma skimming (Ref. 54'den değiştirilerek alınmıştır).

200-300 μm 'den küçük bir arteriolün kesiti boyunca eritrositler en yoğun olarak merkez bölgede bulunurlar, merkezden uzaklaştıkça eritrosit miktarı azalır. Endotele bitişik yüzeyde plazma ve beyaz kan hücreleri (BKH) bulunur. Kan akımının hızı da merkezden çevreye doğru azalmaktadır. Dallanma noktalarında kapillerlere geçen kanın hematokritinin azalmasının önemli bir sebebi eritrositlerin damar içindeki bu dağılım şeklidir. Bu dağılımda eritrosit elastikiyeti önemli rol oynar. Neticede dokudaki hematokrit, venöz kandaki hematokritten düşüktür (55).

Mikrodamarlarda akan kanın viskozitesini belirleyen faktörler (51):

1) Hematokrit: Normal kan hacminin %40-45'ini eritrositler oluşturur. Bu hacmin 1/600 kadarını BKH, 1/800 kadarını trombositler oluşturur. Bu hücreler laminar akımı etkileyerek tabakalar arası sürtünmeyi ciddi oranda artırırlar ve de viskozitenin artmasına neden olurlar. Hematokrit ile viskozite arasında eksponansiyel bir ilişki vardır (Şekil 2.15). Orta-büyük boy arterlerde hematokritteki %1'lik artış viskoziteyi %4 arttırabilir.



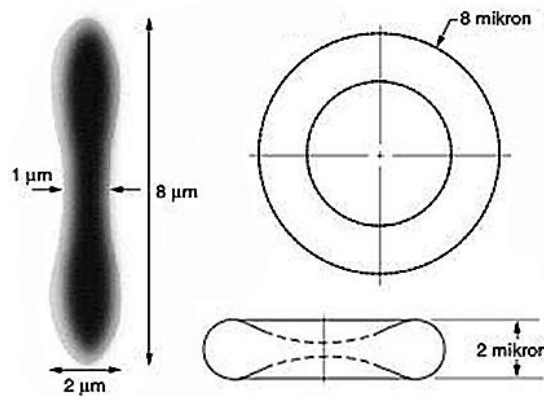
Şekil 2.15. Hematokrit ile viskozite ilişkisi (Ref. 52'den değiştirilerek alınmıştır).

2) Eritrosit kümelenmesi (agregasyonu): Hücresel elemanların sayısı dışında reolojik özellikleri de viskoziteye etki eder. Eritrositler rulo oluşturmaya meyilli hücrelerdir. Bu rulolar birleşerek kümeler de oluştururlar. Özellikle plazma proteinlerinin arttığı durumlarda küme oluşumu artar. Kan

akım hızı arttıkça (kayma gerilimi de artar) kandaki bu rulolar ve kümeler dağılır. Kümeler laminar akımı bozarak viskozitenin artmasına sebep olur. Bu durum hem makro hem de mikrodolaşımda sıkıntıya sebep olur. Eritrosit kümelenme hızı ile ölçülür. İskemi-reperfüzyon esnasında gerek akut faz reaktanlarının artması gerekse eritrosit zarı üzerindeki değişiklikler nedeniyle agregasyona eğilim artar.

3) Eritrosit elastikiyeti: Normal bir eritrositin boyutları Şekil 2.16'da görülmektedir. Eritrositler oldukça elastik hücrelerdir. Damar içinde akarken su damlası gibi rahat eğilip bükülebilirler. Bir eritrositin büyüklüğü kapiller damarların büyüklüğünden fazla olduğu için eritrositler bu damarlardan geçerken deforme olurlar. Düşük pH, hücre içi kalsiyum miktarının artması, elektrolit dengesinin bozulması gibi nedenler eritrosit elastikiyetini bozar.

İskemi reperfüzyon sonrası ortamdaki miktarı çok artan serbest oksijen radikalleri oluştukları yere göre eritrositlerin hem elastikiyetini bozar hem de kümelenmeye eğilimini etkiler. Eritrositlerin dışında oluşan radikaller düşük konsantrasyonlarda kümelemeyi artırırken yüksek konsantrasyonlarda azaltırlar. Hücre içinde oluşan radikallerin etkisi ise eritrosit elastikiyetini bozmak şeklindedir.



Şekil 2.16. Eritrositin boyutları (Ref. 29'dan değiştirilerek alınmıştır).

4) Plazma viskozitesi: Plazma *Newtonian* bir sıvıdır ve normalde viskozitesi 1,1-1,35 cP civarındadır. Ancak akut faz reaktanlarının arttığı durumlarda veya paraproteinemilerde 5-6'ya kadar çıkabilir.

5) Beyaz kan hücreleri: Eritrositlere oranla çok daha az sayıda olan bu hücrelerin mikrodolaşıma etkisi ihmal edilebilir seviyededir. Ancak patolojik durumlarda aktive olmuş beyaz kan hücreleri mikrodamarlarda özellikle de venüllerde endotel hücrelere tutunarak viskoziteyi arttıırırlar ve kan akımının yavaşlamasına sebep olurlar. Bir çalışmada 100 μm 'lik bir postkapiller venüle tutunmuş olan 12 BKH'nin bu damardaki direnci iki katına çıkardığı tespit edilmiştir (56). Bu hücreler ayrıca salgıladıkları maddelerle eritrosit agregasyonunu da arttıırırlar.

2.4. Endotel-Kan Hücresi Etkileşimleri ve Kapiller Kan Akımı

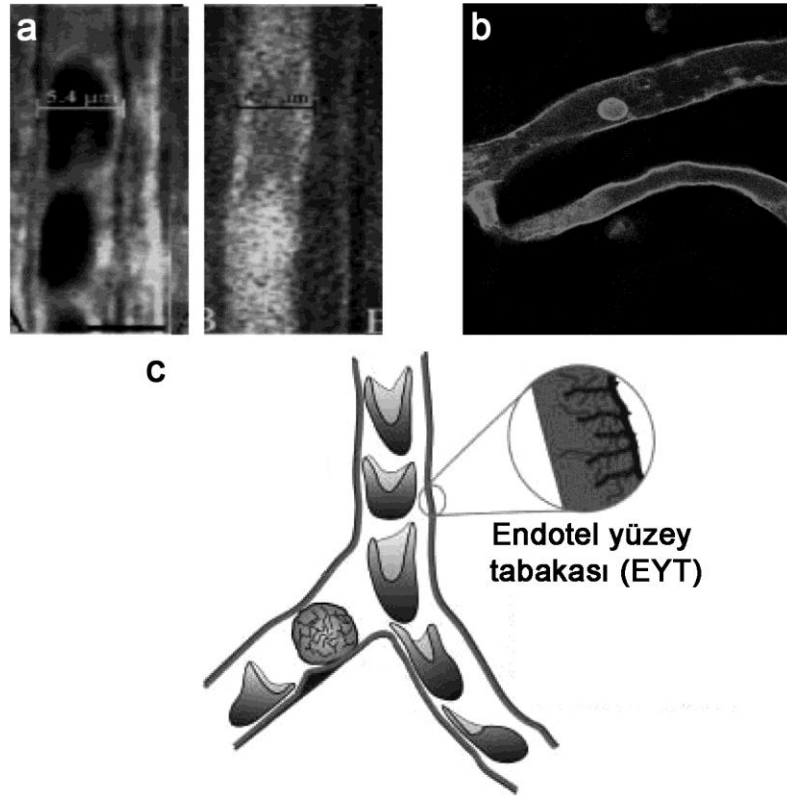
Canlılar arasında vücut büyüklükleri ne olursa olsun eritrosit boyutu çok az farklılık gösterir ve daima bir eritrositin genişliği bir kapiller damarın genişliğinden büyüktür. Bu nedenle eritrositler kapillerlerden geçerken deforme olarak asimetrik paraşüt benzeri bir şekil alırlar.

Kapiller kan akımını ölçebilmek için eritrosit hızı, birim zamanda geçen eritrosit sayısı (akım), ve geçiş zamanı gibi parametreler kullanılmaktadır. Akım, oksijen dağıtımı hakkında bilgi verir. Akımın en önemli belirleyicilerinden biri o damardaki eritrosit yoğunluğu yani hematokrittir. Kapiller hematokritin aynı çaptaki in vitro tüpün hematokritinden daha düşük olduğunu tespit edilmiştir. Bu gözleme dayanarak endotel yüzeyinden lümene uzanan, yaklaşık 1 μm kalınlığında, kalınlığı kayma hızına (*shear rate*) bağlı değişen bir kapiller glikokaliksin varlığını önermişlerdir. Sonraki çalışmalarda glikokaliksten başka makromoleküllerin de bu yapıya katkıda bulunduğu saptanmıştır ve bu yapıya endotel yüzey tabakası (EYT) adı verilmiştir (53). Bu tabakanın kalınlığı eritrosit hızına bağlı olarak değişir: 0,1 mm/sn hızında yaklaşık 1 μm iken, 0,4 mm/sn hızında 0,2 μm 'nin altına düşer. İşlevinin kapiller damarların uzunlukları boyunca çaplarında meydana gelen değişiklikleri tamponlayarak eritrosit deformasyonunu etkilemek ve muhtemelen de ömrünü uzatmak olduğu düşünülmektedir.

Yumuşak ve elastik özellikteki eritrositler bu tabakanın dışından geçerken, büyük ve sert BKH'ler bu tabakayı ezerek ve düzleştirerek kapiller

boyunca ilerler. Ancak bu geçişin ardından bu tabaka 1-2 saniyede tekrar eski halini alır.

Bu tabakanın dinamik bir tabaka olduğu ve kayma hızının miktarına bağlı olarak kaybolan kısmın sürekli endotel hücresi tarafından yenilendiği düşünülmektedir. Bu tabakanın heparinaz ile yıkılması sonrası yapılan deneylerde, EYT'si yıkılmış damar içinde hematokritin 3 katına kadar çıkabildiği saptanmıştır (57). Bu damarlarda BKH-endotel adezyonu da artmıştır. Bu artışın ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin erişilebilirliğinin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Flüoresan işaretli dekstranla yapılan deneyler bu tabakanın varlığını görsel olarak da ispatlamıştır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Endotel yüzey tabakası (Ref. 53'ten değiştirilerek alınmıştır).

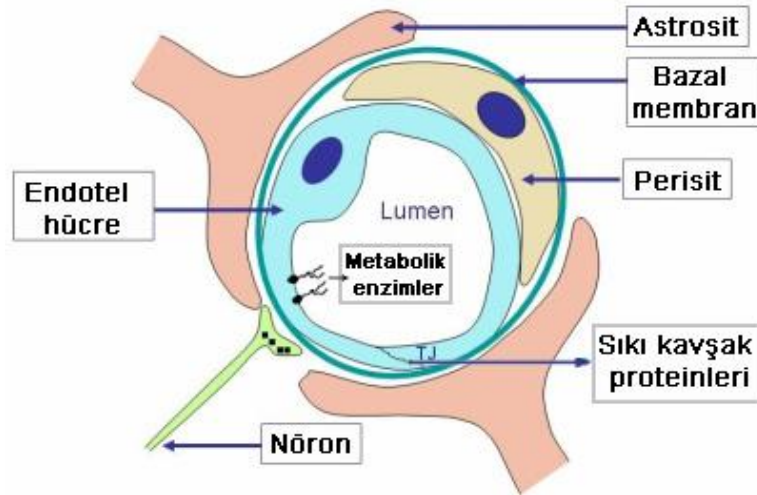
İnflamasyon sonrası ve 60 dakikalık iskemiye takip eden reperfüzyon sonrasında bu tabakanın kalınlığının zamanla azaldığı gözlenmiştir (58). Bu tabakanın kalınlığındaki değişim kan akımına karşı olan direnci veya

viskoziteyi ciddi oranda değiştirebilmektedir. Örneğin 6 μm çapında 1 μm kalınlığında EYT'si olan bir kapillerin direncinin aynı çapa sahip bir cam kapiller tpnkinden 8 kat fazla olduğu tahmin edilmektedir (59). EYT kalınlığı 0,5 μm olsaydı bu fark 2 kata düşerdi (60).

2.5. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri, olgunlaşmış nörovasküler ünitenin oldukça özelleşmiş bir yapısıdır. KBB'nin endotel hücreleri, diğer endotellerden fenestrasyonların olmayışı, sıkı kavşak proteinlerinin fazlalığı ve pinositik veziküllerin azlığı ile ayrılır. Sıkı kavşak proteinleri hidrofilik moleküllerin paraselüler yolla KBB'yi geçmesine engel olur. O_2 ve CO_2 gibi lipofilik moleküller ise plazma membranları boyunca serbestçe difüze olabilir. Glukoz ve amino asitler beyne taşıyıcı proteinler sayesinde girerlerken, insülin, leptin, transferin gibi daha büyük moleküller reseptör-aracılı endositozla girerler (61).

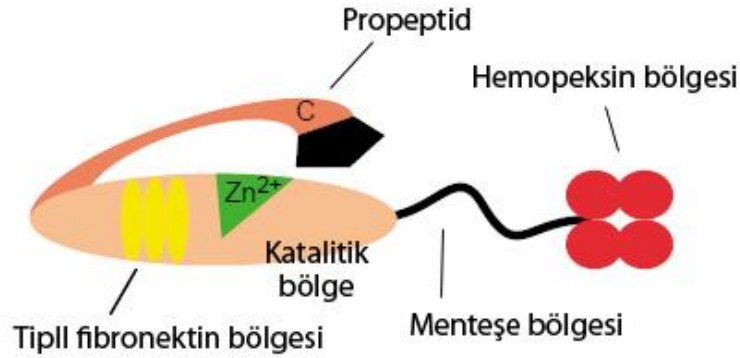
KBB; vasküler endotel hücreleri, bu hücreler arasında yer alan sıkı kavşak proteinleri (zonula okludens-1, okludin, kladin-5) ve yapışkan kavşak proteinleri, astrosit son ayakları, bazal lamina ve bazal laminayı oluşturan proteinler (laminin, tip 4 kollajen), beyin ekstraselüler matriks proteinleri (elastin, fibronektin, tenaskin gibi) ve perisitlerden oluşmaktadır (62, 63). Serebral damarlarda bulunan endotel hücrelerinde diğer dokulardakinden 5-6 kat fazla mitokondri bulunduğu bildirilmiştir (64). Ayrıca pinositik vezikül sayısı da daha azdır. Endotel ve perisit hücrelerinin etrafını saran bazal lamina 30-40 nm kalınlığındadır ve de astrosit son ayaklarının plazma membranıyla devamlılık gösterir. Fiziksel kan beyin bariyerinin dışında metabolik bir bariyer de mevcuttur. Endotel zarının luminal tarafında ilaçları ve besin maddelerini metabolize eden δ -glutamil transpeptidaz (δ -GTP) ve alkalin fosfotaz (AP) enzimleri bulunur (65) (şekil 18).



Şekil 2.18. Kan beyin bariyeri elemanlarının şematik gösterimi (Ref. 66'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.6. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar, katalitik bölgesinde çinko elementi bulunduran proteaz grubu üyesi enzimlerdir (Şekil 2.19). Ekstraselüler matriks yapılanması, hücre gelişimi, akson yön bulması, inflamatuvar yanıt oluşumu, KBB geçirgenliğinin düzenlenmesi gibi pek çok önemli görevleri vardır. Memelilerde 24 farklı MMP bulunur. Beyninde en sık bulunanlar MMP-2 ve MMP-9'dur (67). MMP-2 beyin parankiminde ve BOS'ta normal koşullarda da bulunurken, MMP-9 proinflamatuvar koşullarda salgılanmaktadır. KBB'yi oluşturan yapılarda özellikle astrosit ve endotelde MMP'lerin yer aldığı bilinmektedir (68). Kollajeni yıkan bu iki enzime kollajenazlar veya jelatinazlar da denir. Bu özelliklerinden yararlanılarak jelatin zimografi yöntemi geliştirilmiştir (69). Bir kollajenaz 4 ana kısımdan oluşur (70). Propeptid kısmı katalitik bölgedeki çinko atomlarının üzerini kapatarak enzimatik aktiviteyi engeller. MMP aktivasyonu bu bölgenin ya enzimatik yıkımla ya da başka yollarla ortadan kalkması ile gerçekleşmektedir. Hemopeksin bölgesi substrat seçiciliğini sağlarken fibronektin tiplII tekrarları kollajene bağlanmayı sağlamaktadır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Kollajenazların yapısı (Ref. 70'den değiştirilerek alınmıştır).

MMP'lerin ekspresyon ve aktivasyonları sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kontrol mekanizması temel olarak 3 seviyeden oluşmaktadır:

- 1) Bu enzimler yalnız hücre aktivasyonu veya uyarılması sonucunda ifade edilirler (transkripsiyon).
- 2) Proenzim yapısında salgılanırlar ve diğer MMP'ler tarafından kısmi yıkıma uğrayarak aktif hale getirilirler.
- 3) Dokuda TIMP (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*) ve serumda α -2 makroglobulin gibi proteinler tarafından inhibe edilirler.

MMP-9'un iskemi ve reperfüzyon sonrası aktive olarak KBB hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (11). Bu aktivasyonun gerçekleşmesinde farklı aktivasyon mekanizmaları etkili olabilir. Örneğin Gu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NO'nun MMP-9 proteininde S-nitrozilasyona sebep olarak bu enzimin aktivasyonuna neden olabileceğini göstermişlerdir (14). Ayrıca plazmin ve stromelizin de MMP aktivasyonuna sebep olabilmektedir (71). Ancak, reperfüzyon sonrası MMP aktivasyonunun mekanizmaları net olarak bilinmemekte ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir.

2.7. Peroksinitrit

Serebral iskemi ve reperfüzyon sırasında mikrodamarlarda yoğun olarak NO ve süperoksit, dolayısıyla peroksinitrit oluşur. Oluşan peroksinitritin KBB hasarında rol oynadığı bilinmektedir. Güçlü bir oksidan olan

peroksinitrit, NO ve süperoksitin doğada bilinen en hızlı reaksiyonlardan birine girmesiyle oluşmaktadır (Hız sabiti= $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Şekil 2.20). Bu reaksiyonun hız kısıtlayıcı basamağı NO ve süperoksitin difüzyon hızıdır (72). NO ve süperoksit moleküllerinin oluşumundaki her 10 kat artış peroksinitrit oluşumunda 100 kat artışa neden olmaktadır (73). Fizyolojik koşullarda peroksinitritin yarı ömrü çok kısadır (1,9 sn) ve başlıca nitrat ve nitrite dönüşmektedir (74, 75). Bu nedenle de difüzyon mesafesi dardır. En yakınındaki moleküllerle etkileşerek lipid peroksidasyonu, tirozin nitrasyonu, sülfidril oksidasyonu, nitrozilasyonu ve DNA hasarlanması gibi birçok mekanizma ile nöron hasarına neden olur (76). Protein etkileşiminin temel mekanizması tirozin aminoasitlerinin nitrasyonudur. Nitrotirozin oluşumunun posttranslasyonel bir mekanizma olarak protein aktivitesini değiştirebildiği bilinmektedir (77).



Şekil 2.20. Peroksinitritin oluşumu

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Anestezi

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kuruluna başvurulmuş, 03.07.2008 tarih ve 2008/55-3 sayılı izin alınmıştır.

İntravital görüntüleme deneyleri için 25-35 gr ağırlığında toplam 14 Swiss albino fare kullanıldı. Retinal mikrodamar izolasyonu için 6-8 haftalık SV-129 fareler kullanıldı (n=3).

Fareler 18-21°C oda sıcaklığında 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda tutuldu ve deney öncesi bir gece aç bırakıldı. İntravital görüntüleme öncesi gerçekleştirilen cerrahi işlemler sırasında fareler izofluran anestezisi ile inhalasyon yoluyla (2-3 mL/dk), intravital görüntülemelerin yapıldığı 4 saat boyunca ise intraperitoneal (i.p.) üretan (750 mg/kg, 30 dakika sonra 500 mg/kg) ve i.p. ksilazin (5 mg/kg, Alfazyne, Alfasan, Hollanda) anestezisi ile uyutuldu. Rektal sıcaklık monitorize edilerek homeotermik battaniye kontrol ünitesi (Harvard Apparatus) ile vücut sıcaklığı $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutuldu. Ortalama arteriyel kan basıncı takibi, fare anestezisi altında olduğu süre boyunca, kan basıncı takip cihazı (NIBP Controller, ADInstruments) ile kuyruktan gerçekleştirildi. İskemi oluşturulmadan hemen önce intraarteriyel kateter yoluyla heparin (10 Ü) verildi.

3.2. Serebral Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelenmesi Çalışmasında Kullanılan Deney Grupları

İskemi/Reperfüzyon Grubu: Altı adet Swiss albino fareye 2 saat orta serebral arter (OSA) tıkanması ve 2 saat reperfüzyon yapıldı. Bu fareler 2 alt grupta incelendi. Reperfüzyondan 15 dakika önce farelere i.p. olarak:

- 1) Serbest radikal tutucu *N-tert*-bütil- α -fenilnitron (PBN, Sigma) (100 mg/kg/0.1cc, n=3,) veya
- 2) Salin (0.1cc, n=3) verildi.

Topikal Peroksinitrit Grubu: Peroksinitritin mikrodamarlar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 3 alt grup oluşturuldu. Kraniyal pencere açıldıktan sonra, farelerin pial damarların üzerine 10 dakika boyunca topikal peroksinitrit uygulaması yapıldı. Peroksinitrit uygulamadan 30 dakika önce başlanarak ve uygulamanın sonuna kadar intraarteriyel sürekli infüzyonla:

- 1) Ebselen tedavisi (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on) (Cayman Chemical), (12 mg/kg dozda, DMSO içinde, n=4,), (glutatyon peroksidaz benzeri peroksinitrit tutucu molekül) veya
- 2) DMSO taşıyıcı (Dimetil sülfoksit) (Amresco Life Science Research Products & Biochemicals) solüsyonu (SF içinde %60, n=2,), (ebseleni vermek için kullanılan taşıyıcı solüsyon) verildi.
- 3) Üçüncü gruba yalnızca topikal peroksinitrit (0,5 µmol, n=2) uygulandı.

3.3. İntraarteriyel Kateterizasyon

İzofluran anestezisi altındaki farelere sırtüstü yatırılarak pozisyon verildi, ardından Stereomikroskop (Zeiss Stereomikroskop, SV6) altında femoral arter kateterize edildi. Kateterizasyon için yüzeyel dokular temizlenip sol femoral arter etrafındaki dokulardan ve vasküler yapılardan izole edildi. P10 kateteri (Intramedic) arter boyunca ilerletilerek sabitlendi. Kateterin ucuna heparinli steril salin (20 Ü/mL) içeren 1 mL'lik enjektör takıldı.

3.4. Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli

Farelerde geçici fokal OSA tıkanması / reperfüzyon modeli intraluminal filaman metodu kullanılarak yapıldı. Öncelikle tıkaçıcı ip hazırlandı. Bunun için, 15 mm uzunluğunda 8-0'lık naylon filamanın yaklaşık 8 mm'lik uç kısmı silikon (Xantropen M Haereus Kulzer, ve Optosil®-Xantropen Activator, Bayer, Almanya) ile küntleştirilip kalınlaştırıldı (Şekil 3.1).

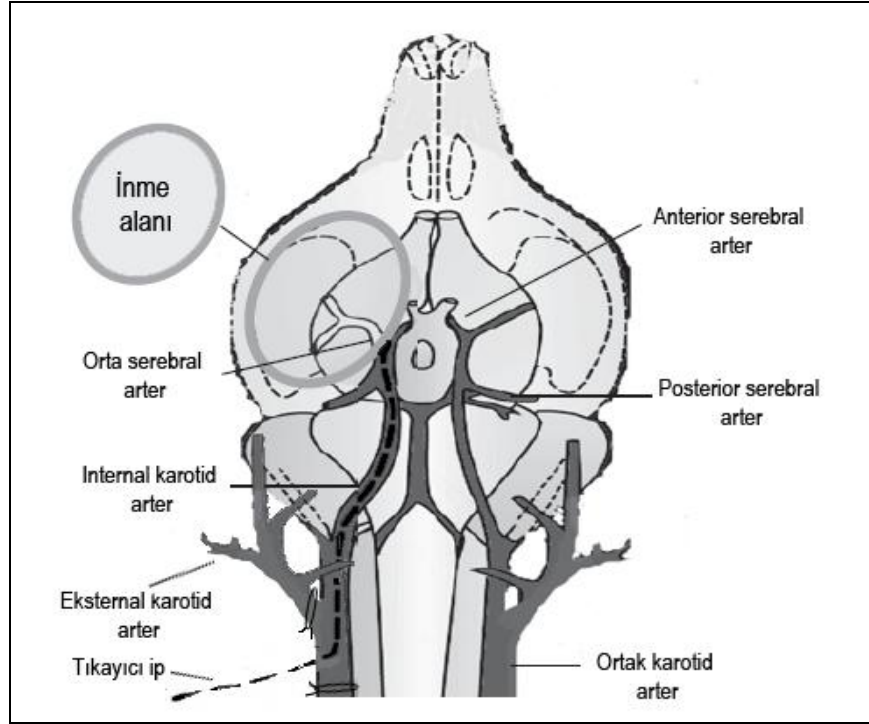


Şekil 3.1. İntraluminal filaman modelinde kullanılan tıkama ipi (Ref. 78'den değiştirilerek alınmıştır).

Önceden hazırlanmış olan tıkayıcı filaman karotis internaya kadar ilerletilerek 5-0 ip ile bağlanarak sabitlendi. İnternal karotit artere yerleştirilen klip bu esnada kaldırıldı. Bu aşamadan sonra kraniyal pencere deneylerine geçilip flüoresan boya verilerek bazal görüntüler alındıktan sonra filaman orta serebral artere doğru ilerletildi ve direnç hissedildiğinde bırakıldı (Şekil 3.2). İki saat iskemi sonrasında filaman geri çekilerek reperfüzyon sağlandı.

3.5. Kraniyal Pencere Açılması

Kateterizasyonu takiben, deney hayvanı yüz üstü pozisyonda, dış kulak yollarından ve burundan sabitlenecek şekilde stereotaksi çerçevesine (Digital Lab Standard Stereotaxic Frame, Stoelting, Amerika Birleşik Devletleri) yerleştirildi. Bregma ve sağ parietal, frontal kemikler görülecek şekilde cilt kesisi yapıldı. Beyin yüzeyini açığa çıkarmak amacıyla, yüksek hızlı matkap yardımı ile parietal kemikte 5x5 mm'lik bir kemik bölgesi inceltildi. Sürtünmeyle oluşan ısıнын azaltılması amacıyla +4°C'deki yapay BOS (yBOS) ile soğutma sağlandı. İnceltelen kemik, laminektomi forsepsi yardımı ile kaldırıldı. Bu esnada duranın hasar görmemesine dikkat edildi. Açılan kraniyal pencerenin etrafı dental akrilik (*Meliodent*, Bayer Dental, Almanya) ile çevrelenerek havuz oluşturuldu. Havuz, yBOS (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 1,3 mM MgSO₄, 2,4 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, ve 10 mM glukoz; 37°C'de, 95% O₂-5% CO₂ ile pH=7,4) ile doldurularak serebral damarların içinde bulundukları fizyolojik koşullar devam ettirildi.



Şekil 3.2. İntraluminal filaman metodu ile OSA orijininin tıkanması şematik olarak görülmektedir (Ref. 78'den değiştirilerek alınmıştır).

3.6. Topikal Peroksinitrit Uygulanması

Peroksinitrit literatürde belirtildiği şekilde sentezlendi (Bkz. Bölüm 3.10.2). 0,1 M sodyum hidroksit solüsyonu içerisinde 1:500 oranında seyreltilen stok solüsyonun abzorban değerleri spektrofotometre ile ölçüldü. 4 kere ölçüm yapıldıktan sonra ortalama abzorban değeri hesaplandı. Tükenme (*extinction*) katsayısı ($1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kullanılarak sentezlenmiş olan peroksinitritin konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 3.3).

Son konsantrasyonu 5 mM olan peroksinitrit elde etmek amacı ile 5 μL peroksinitrit stok solüsyonu, 45 μL 0,1 M Tris HCl tampon çözeltisine (pH=7,4) eklendi. 10 μL 'lik karışım, mikropipet kullanılarak, dakikada bir, topikal olarak beyin yüzeyine uygulandı. Beşinci dakikada aynı karışım taze olarak tekrar hazırlandı ve aynı yöntemle 5 dakika daha verildi. Böylece peroksinitrit, 0,05 mikromol/dakika dozda 10 dakika süreyle uygulanmış oldu.

Spektrofotometrede ölçülen abzorbars değeri = 0,174 (500 kat seyreltilmiş peroksinitrit için)

$$0,174 \times 500 = 87;$$

1 M peroksinitritin abzorbars değeri = 1670 ise

Abzorbars = 87 ölçülen çözeltinin peroksinitrit derişimi kaçtır?

$$\rightarrow 87/1670 = 0,052 \text{ M} \approx \underline{50 \text{ mM}} \text{ peroksinitrit}$$

Şekil 3.3. Peroksinitrit konsantrasyonunun hesaplanması.

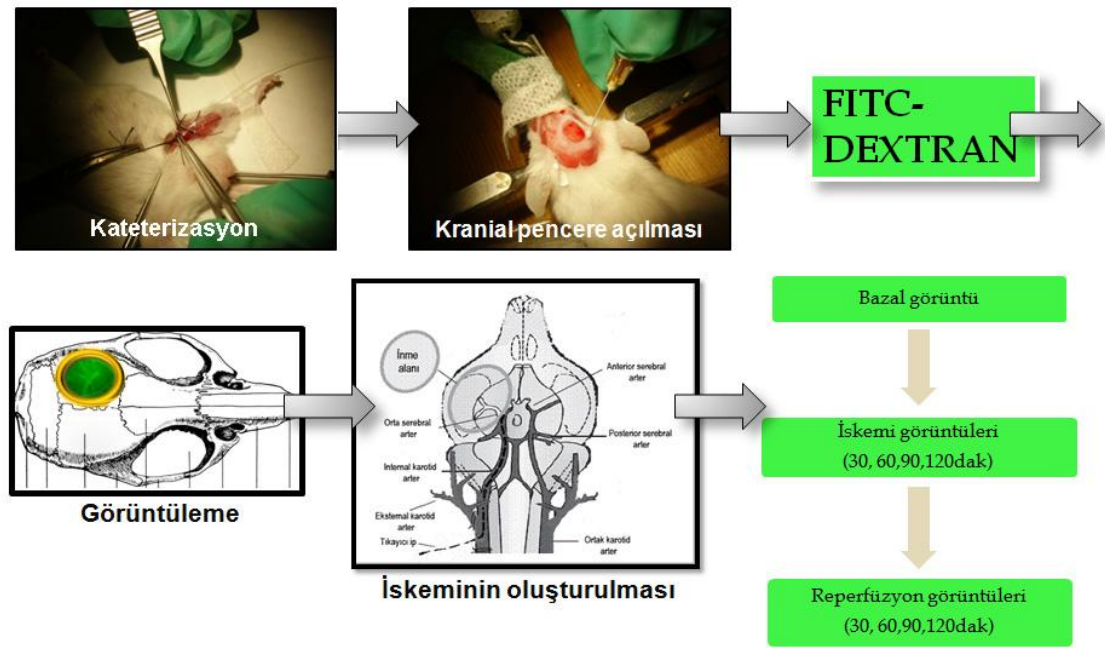
Ebselen (12 mg/kg), 120 µL'lik DMSO-serum fizyolojik (SF) karışımı (%60 DMSO) içerisinde çözüldükten sonra peroksinitrit uygulanmasından 30 dakika önce intraarteriyel olarak verilmeye başlandı (1 mikrolitre/dakika). Peroksinitrit uygulanmasından 5 dakika önce hızı 5 mikrolitre/dakikaya ayarlanarak deney sonuna kadar intraarteriyel olarak verilmeye devam edildi. Taşıyıcı grubuna ise aynı hızla sadece DMSO-serum fizyolojik (%60) karışımı verildi.

3.7. Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelenmesi

Flüoresan izotiyosiyanat-dekstran 70S (FITC-dekstran, moleküler ağırlık=70.000 kDa, Sigma-Aldrich) kan beyin bariyeri hasarlanmadığı sürece damar dışına çıkmayan ve vasküler yatağı görüntülemeye yarayan bir flüoresan işaretleyicidir. Kateterizasyonu ve kraniyal pencere açılmasını takiben 0,1 mL SF içerisinde 5 mg/mL FITC-dekstran 70S intraarteriyel olarak verilerek kraniyal pencereden vasküler yapılar ve beyin dokusuna ait bazal görüntüler flüoresan eklentili stereomikroskop yardımı ile alınmıştır. Takiben, iskemi ve reperfüzyon deneyleri için, intraluminal ip yöntemiyle OSA tıkanarak 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon oluşturulmuştur. Bunun için önceden karotis interna seviyesinde bırakılan ip, orta serebral artere doğru

ilerletilip direnç hissedildiğinde bırakılmıştır. İki saat iskemi sonrasında ip geri çekilerek reperfüzyon sağlanmıştır. Bu aşamada 0,1 mL FITC-dekstran 70S ek doz olarak verilmiştir. Tedavi grubundaki hayvanlara reperfüzyondan 15 dakika önce 100 mg/kg/0.1mL i.p. PBN verilmiştir. Deneyler süresince yarım saatte bir görüntü alınmıştır. (Şekil 3.4). Her görüntüleme işlemi sırasında beyin yüzeyinin eğimli yapısı nedeni ile en az 3 adet farklı alana odaklanmış görüntüler alındı.

Topikal peroksinitrit deneyleri için, benzer sıralama ile bazal görüntülerden önce FITC-dekstran 70S aynı yöntemle verilmiş, peroksinitrit uygulanması sırasında dakikada bir (her bir peroksinitrit uygulamasının ardından) görüntü alınmıştır.



Şekil 3.4. İntravital görüntüleme deneyleri: İskemi/reperfüzyon grubu deney şeması özetlenmektedir.

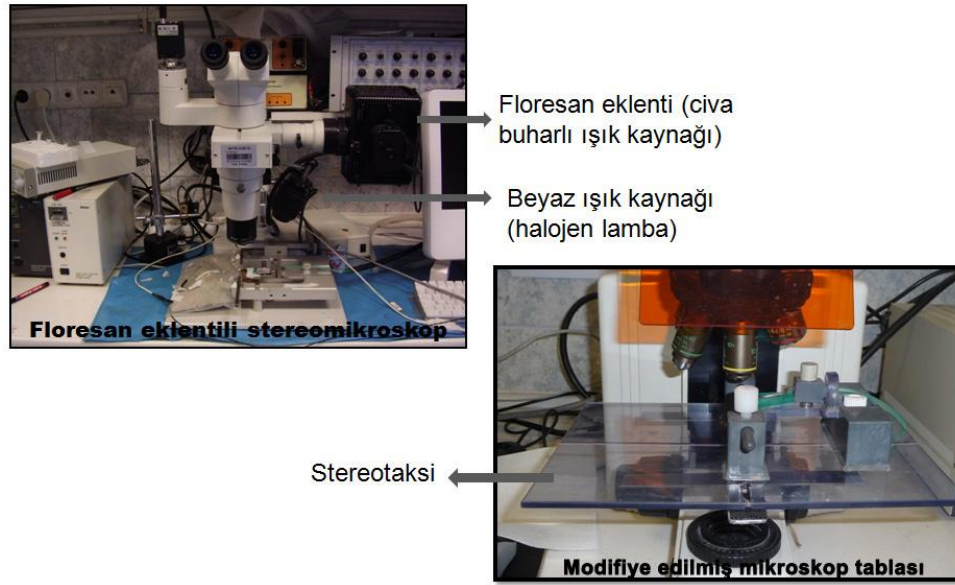
3.7.1. Donanım ve Yazılım

Görüntülemeler için:

- *Nikon SMZ1000* flüoresan eklentili stereomikroskop,
- *Nikon Eclipse E600* flüoresan eklentili mikroskop

- *Nikon DXM1200* renkli kamera,
- *NIS Elements Advanced Research Software v2.3*'ten oluşan bir sistem kullanıldı.

Stereomikroskop ile 40 kat ve 80 kat büyütülmüş görüntüler alındı. 100X büyütmede görüntü alabilmek için stereotaksik çerçeve yerleştirmeye uygun hale gelecek şekilde modifiye edilmiş *Nikon Eclipse E600* flüoresan eklentili mikroskop kullanıldı (Şekil 3.5). İskemi/reperfüzyon süresince, yarım saatte bir, beyaz ışık kaynağı ile aydınlık saha; cıva buharlı ışık kaynağı ve flüoresan filtre ile yeşil flüoresan görüntülemeler yapıldı. Geniş bir alanı görüntüleyebilmek amacıyla, her zaman diliminde en az 3 adet farklı alana odaklanmış görüntüler alındı. Görüntüler, *NIS Elements Advanced Research Software v2.3* ile dijitalize edilerek “*tiff*” formatında sabit sürücüye kaydedildi.



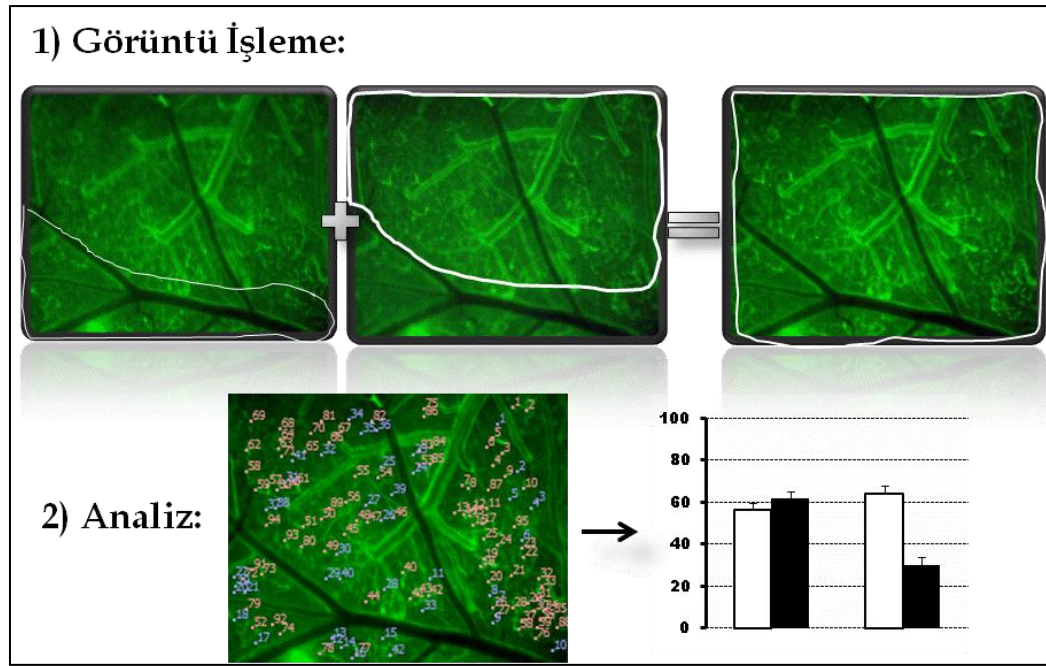
Şekil 3.5. Görüntülemede kullanılan mikroskoplar görülmektedir.

3.7.2. Analiz

Görüntülerin analizi aşamasında öncelikle görüntülerin analize uygun hale getirmesi için farklı alanlara odaklanmış aynı zaman dilimine ait resimler üst üste getirilerek tam olarak çakışmaları sağlandı (*alignment*). Daha sonra her bir resmin odaklanmış olduğu alanlar birleştirilerek tek bir resim haline

getirildi (*blending by stacking*). Bu yöntem sayesinde geniş bir alanın net görülebildiği resimler elde edilebildi.

Daha sonra elde edilen resimlerin analizine geçildi. Bunun için, resimlerdeki 12 mikrondan küçük bütün mikrodamarlar sayıldı ve üzerinde boğumlanma olanlar ve olmayanlar olarak ikiye ayrılarak sınıflandırıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Görüntüleme ile elde edilen verilerin analiz yöntemi görülmektedir.

3.8. Damar içerisine hapsolmuş eritrositlerin sodyum borohidrit boyaması ile gösterilmesi

İskemi/reperfüzyon sonrasında mikrodamarlar içerisinde hapsolmuş eritrositlerin tespiti için sodyum borohidrit (NaBH_4) kullanıldı (79).

İntravital görüntüleme deneylerinin sonunda fareler yüksek doz (1 g/kg) kloralhidrat anestezisi ile uyutuldu. 100 mL heparinli fizyolojik serum, ardından 200 mL %4 paraformaldehit solüsyonu ile kardiyak perfüzyon gerçekleştirildi. Bu sayede damarlar içindeki serbest haldeki eritrositler yıkanmış oldu. Beyinler dekapitasyon ile çıkartıldı, 1 gün boyunca oda sıcaklığında %10 paraformaldehit solüsyonunda bekletildi. İskemik bölgeden

1 mm kalınlığında parafin bloklar hazırlandı ve 6 µm kalınlığında doku kesitleri alındı.

Kesitler, 56°C'de 1 gece deparafinize edildi. Ksilol ardından etanol ile hidrate edildi ve PBS'le yıkandı. Takiben PBS içinde hazırlanmış %0,2 sodyum borohidrit çözeltisiyle 30 dakika muamele edildi. Sürenin sonunda kesitler tekrar PBS ile yıkandı, *Hoechst 33258* (Sigma) (flüoresan ışımaya yapan hücre çekirdeği boyası ve kapatma solüsyonu) ile kapatıldı.

İndirgeyici bir molekül olan NaBH₄, hemoglobinin yapısında bulunan demir ile reaksiyona girerek, ona flüoresan özellik kazandırır. Flüoresan eklentili bir mikroskop ve 510-560 nm dalga boyundaki ışığı geçiren bir flüoresan filtre yardımıyla, damarlar içerisinde hapsolmuş eritrositler kırmızı ışığın dalga boyuna denk gelen flüoresan ışık yayarlar. Deney gruplarında yapılan boyamalar sonrasında 20X büyütmede iskemik ve iskemik olmayan hemisferlerden görüntüler alındı.

3.9. İzole edilmiş Retinal Mikrodamarların *in vitro* Görüntülenmesi Deneyleri

3.9.1. Deneylerin Yapılışı

Hazırlık deneylerinde daha önceki deney paradigmalarında kullanılan fare ırkı olan Swiss albino retinasından izolasyon yapılmaya çalışıldı ancak, retinal pigment bulundurmeyen Swiss albino cinsi farelerden retina izolasyonu yapmanın teknik açıdan çok zor olduğunun anlaşılması üzerine, bu deneyler için 6-8 haftalık SV-129 fareler kullanılmasına karar verildi. Fareler yüksek doz (1 g/kg) kloralhidrat anestezisi ile uyutulduktan sonra hızlı bir şekilde her iki göze enükleasyon yapıldı. Gözler +4°C'deki idame solüsyonu içerisine (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 10 mM Na-Hepes, 15 mM mannitol ve 5 mM glukoz; ozmolarite ölçüldü ve distile su ile 310 miliosmol/L olarak ayarlandı) konuldu. Damardan zengin retina tabakası stereomikroskop altında gözün diğer katmanlarından ayrıştırıldı. 2,5 mL Earle'ün dengeli tuz solüsyonu (Sigma-Aldrich E3024; ek

olarak 0.5 mM EDTA, 20 mM glukoz, 15 Ü papain (Sigma-Aldrich) ve 2 mM sistein) ile 33°C'de 15 dakika süreyle enkübe edildi. Solüsyon içerisindeki papain enzimi, mikrodamarların etrafındaki kollajeni yıkarak damarların retina dokusundan ayrışmalarını ve etraflarındaki perisitlerle birlikte daha kolay görüntülenebilir hale gelmelerini sağladı. Solüsyonlar, pH'larını 7,4'te tutabilmek ve oksijenasyonun devamını sağlayabilmek amacıyla bütün deneyler süresince %95 oksijen-%5 karbondioksit gaz karışımı ile havalandırıldı. 15 dakikalık enkübasyonun ardından retinalar idame solüsyonuna aktararak deney yapılana kadar bu ortamda tutuldu.

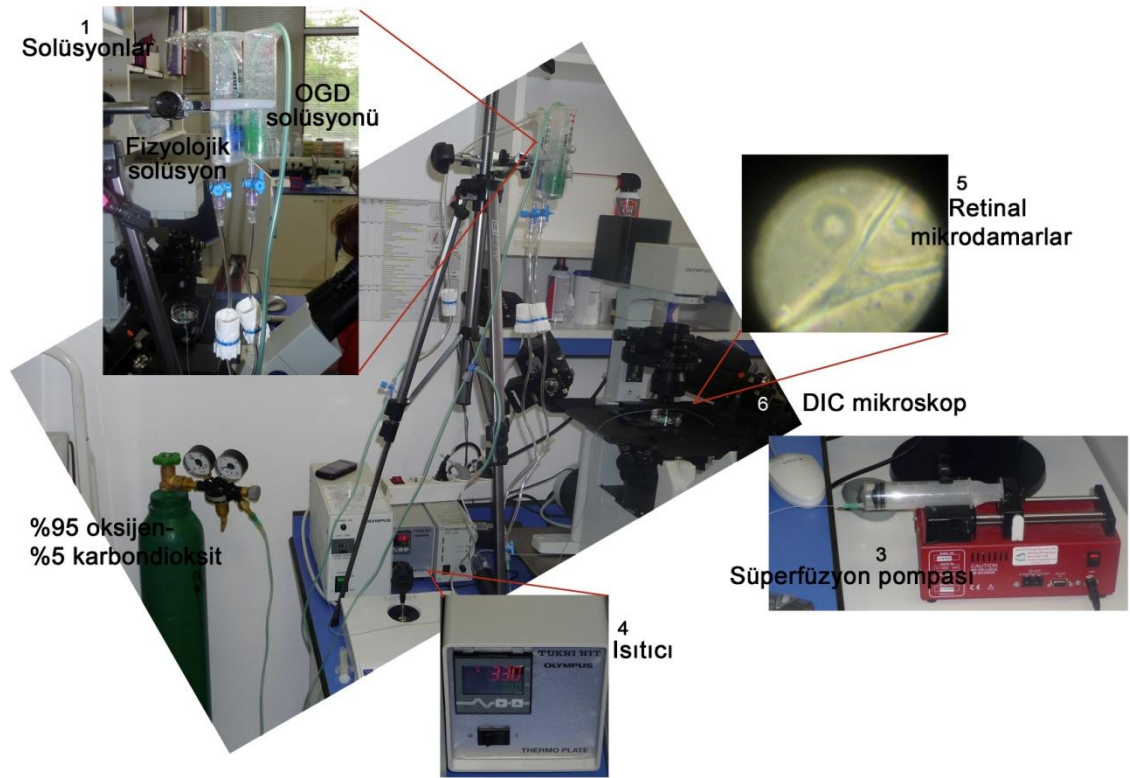
İskemi/reperfüzyonu taklit etmek için OGD/reoksijenizasyon deneyleri yapıldı. Bu amaçla, bir retina parçası alınarak vitreal yüzü yukarı bakacak şekilde 60 mm'lik petri kabına konuldu. 33°C'deki, oksijen ve glukoz içeren fizyolojik solüsyon ile (124 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM d-glukoz; karbojen ile havalandırıldı) süperfüze edildi. OGD oluşturmak için retinalar, glukoz yerine 7 mM sükroz içeren ve karbojen yerine %95 N₂-%5 CO₂ ile havalandırılmış olan iskemik solüsyon ile 30 dakika enkübe edildi. Reoksijenasyon (reperfüzyon) iskemik solüsyon yerine tekrar fizyolojik solüsyon 30 dakika süreyle uygulanarak sağlandı. PBN verilen deneylerde, PBN (100 µM olacak şekilde) reoksijenasyon solüsyonuna eklendi (Şekil 3.7).

Peroksinitrit uygulanan grupta, peroksinitrit A solüsyonunda seyreltilerek (30 µM konsantrasyonda), hacimce 1:1 oranında retinanın üzerine eklendi ve 30 dakika boyunca görüntüler alındı.

3.9.2. Deney Grupları

İzole edilmiş retinal mikrodamarlar 5 grupta incelendi:

- 1) 30 dakika süreyle OGD (n=4 mikrodamar, 9 perisit)
- 2) Önce 30 dakika OGD, ardından 30 dakika reoksijenizasyon (n=1 mikrodamar, 3 perisit)
- 3) Önce 30 dakika OGD, ardından 30 dakika PBN'li solüsyon ile reoksijenizasyon (n=2 mikrodamar, 5 perisit)



Şekil 3.7. İzole edilmiş retinal mikrodamarların *in vitro* görüntülenmesi deneylerinde kullanılan teçhizatlar.

- 4) Peroksinitrit (fizyolojik solüsyon içerisinde, 30 μ M, n=3 mikrodamar, 5 perisit)
 - 5) Fizyolojik solüsyon (n=2 mikrodamar, 4 perisit) uygulandı.
- Bütün deneyler boyunca mikrodamarların video görüntüleri kaydedildi.

3.9.3. Görüntüleme ve Analiz

İzole retinalar ısıtıcılı *Olympus IX-71* ters (*inverted*) mikroskobu (Olympus Co., Japan) ile DIC (*Differential interference contrast*) görüntüleme tekniğiyle, 40X objektif kullanılarak görüntülendi. Mikroskobun sağladığı 10 katlık ara büyütme de hesaba katıldığında bu sistem 400 kat büyütme sağlayabilmektedir. Görüntüler *DP Controller Software ver. 3.1.1.267* (Olympus, Japan) yazılımı kontrolündeki *Olympus DP30* monokrom dijital kamera ile alındı. 12 μ m çapından küçük, etrafında tipik kambur görüntüsüne

sahip perisitler bulunduran mikrodamarlara odaklanıldı. Deneyler süresince seri olarak 10–20 saniyede bir resim çekildi ve bu resimler zaman aralıklı video çekimi (*time-lapse video*) olarak kaydedildi. Bu filmler 24 fps *avi* formatında ve tek resimler *jpeg* formatında 1360x1024 piksel çözünürlüğünde kaydedildi.

Görüntü analizi için ölçüm yapılacak mikrodamarlar seçilirken deney süresince damarın odak dışına çıkmamış olmasına önem verildi. Analiz, perisit komşuluğundaki lümen çapları ölçülerek yapıldı. Bazal değerleri ve ayrıca OGD sonrası, reoksijenasyon sonrası ve PBN sonrası en düşük değerleri ölçülerek ortalamaları alındı ve bu değerler gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.10. Matriks Metalloproteinazlar ile Peroksinitrit Etkileşiminin Jelatin Zimografi Yöntemiyle İncelenmesi Çalışması

3.10.1. Deney Grupları

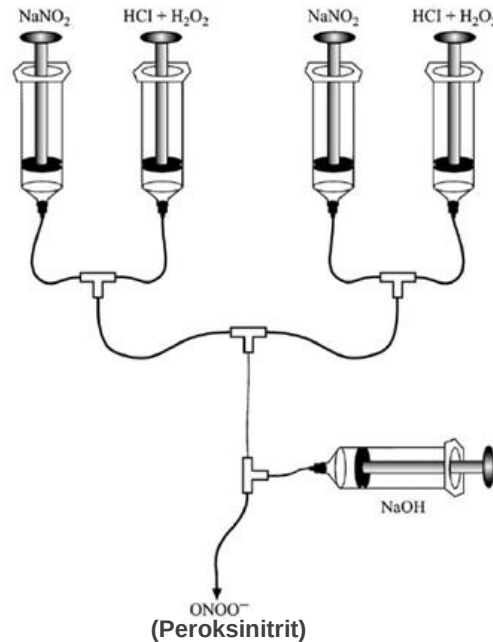
Jelatin zimografi, matriks metalloproteinazların enzim aktivitesini kıyaslamayı amaçlayan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) temelli semikantitatif bir yöntemdir. Bu yöntemde, SDS (denatüre edici madde) ve jelatin içeren poliakrilamid yapıdaki bir jel üzerine çalışılacak proteinler yüklenerek elektroforez ile yürütülür. Proteinler molekül ağırlıklarına göre ağırdan hafife doğru sıralanırlar. Daha sonra, anyonik olmayan bir deterjan olan Triton X-100 (Merck) kullanılarak jel yapısında bulunan SDS yıkanır, böylece proteinler renatüre olabilirler. Ardından, 1-2 gece süreyle optimum enzimatik aktiviteye uygun bir tampon çözelti içinde (*developing buffer*), enzimin jelin içindeki jelatini yıkması beklenir. Sonra Jel *Coomassie mavis*i adlı protein boyası ile boyandığında, jelatin içeren kısımlar maviye boyanırken, MMP2 ve 9 bantlarının bulunduğu yerlerdeki jelatin yıkılmış olduğu için, bantların bulunduğu yer şeffaf kalır (80). En sonda görüntüleme yapıp optik dansite ölçümüyle bantlar ölçülerek analiz yapılır.

Bu çalışmada, rekombinan matriks metalloproteinazlar 2 ve 9 (MMP2 ve 9) deney tüpünde peroksinitrit ile enkübe edilerek MMP aktivasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. Bu deneyler için MMP2 ve 9 proteinleri (Chemicon):

- 1) Farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 10, 100, 1000 μ M) peroksinitritle,
- 2) Peroksinitritin dekompozisyon ürünleriyle (kontrol, 100 μ M) enkübe edildi.

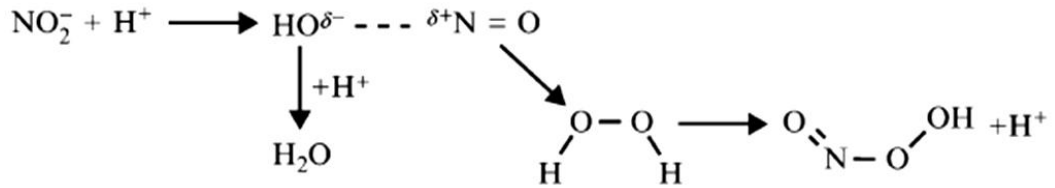
3.10.2. Peroksinitrit Sentezi

Peroksinitrit sentezi Joseph Beckman'ın tarif ettiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi (81). Bunun için öncelikle, 0,7 M HCl + 0,6 M H_2O_2 , 0,6 M $NaNO_2$ ve 3M NaOH solüsyonları hazırlandı, sonra da bu solüsyonlar 30 mL'lik enjektörlere çekilerek bir enjektör pompasına (*Aladdin Programmable Syringe Pump*, World Precision Instruments) yerleştirildi. Bu işlem için pompa, 5 enjektörü alabilecek şekilde modifiye edildi. Hızı 17 mL/dakikaya ayarlanarak belirtilen kimyasalların reaksiyona girmesi sağlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Peroksinitrit sentezinin şematik gösterilmesi (Ref. 81'den değiştirilerek alınmıştır).

Orta kuvvette asidik ortamlarda, nitroz asit kuvvetli bir nitrozonyum donörüdür. Böylece aşağıdaki reaksiyonda da görüldüğü gibi, hidrojen peroksit nitrozonyum katılması sonucu peroksinitroz asit oluşmaktadır (Şekil 3.9):



Şekil 3.9. Peroksinitrit oluşumunun basamakları (Ref. 81'den alınmıştır).

Asidik ortamda, peroksinitroz asitin yarı ömrü 1 saniyeden kısadır, bu nedenle son aşamada karışıma sodyum hidroksit eklenerek yüksek miktarda peroksinitrit anyonu elde edilebilmektedir.

Elde edilen karışım, daha sonra mangan dioksit (MnO_2) taşları üzerinde 30 dakika kadar bekletilerek içerisindeki rezidüel hidrojen peroksinitritten arındırılması sağlandı. MnO_2 taşlarını sentezleyebilmek için şu yöntem kullanıldı: 8 gr potasyum permanganat 50 mL suda çözülerek üzerine 500 mL %95 etanol yavaşça eklendi ve bir gece boyunca karıştırıldı. Karışım ertesi gün 2-3 litre suyla yıkanarak vakum filtrasyonuna tâbi tutuldu. Filtrenin üzerinde kalan kalın kahverengi çökelti toplandı ve birkaç gün kurumaya bırakıldı. Oluşan kahverengi MnO_2 taşları dövülerek yaklaşık 5 mm'lik küçük parçalara ayrıştırıldı.

Sentezlenen peroksinitritin konsantrasyonu spektrofotometrede 302 nm dalga boyundaki abzorbanası ölçülerek hesaplandı. Tükenme katsayısı $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı. Hesaplanan konsantrasyonlar 50-100 mM arasında idi.

3.10.3. Zimogram Jelinin Sentezi

Ticari zimogram jellerinin raf ömrü kısa olduğu için, jeller deney sabahı dökülerek taze olarak hazırlanmıştır. Jeller istif (*stacking*) ve ayırım (*seperating*) jeli olarak iki ayrı kısımdan oluşur. Kullanılan tarif Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Zimogram jeli tarifi.

İSTİF JELİ (%5)		AYRIM JELİ (%10)	
İki kere distile edilmiş su:	3.4 mL	İki kere distile edilmiş su:	3.0 mL
Acrylamide/Bisacrylamide:	0.83 mL	Acrylamide/Bisacrylamide:	3.3 mL
Jel Tamponu-1:	0.63 mL	Jel Tamponu-2:	2.5 mL
		Gelatin:	1 mL
%10 SDS:	0.05 mL	%10 SDS:	0.1 mL
%10 APS:	0.05 mL	%10 APS:	0.1 mL
TEMED:	4 µl	TEMED:	4 µl

Stok Çözeltiler:

1. 30% Akrlamid/ 0.8% Bis-akrlamid 50 mL:

15 gr akrilamid + 0,4 gr bis-akrilamid, 30 ml dH₂O’ya eklenir, tamamen çözünene kadar karıştırılır, 50 ml’ye tamamlanır.

Filtrelendikten sonra 4°C’de folyoya sarılı şekilde saklanmalıdır.

2. Jel-tamponu-1 (=0.5M Tris pH 6,8)

30.25g Tris bazı, 200 mL dH₂O’ya eklenir, pH’sı 6,8’e ayarlanır. İyice karıştırıp çözdükten sonra 500 ml’ye tamamlanır.

3. Jel-tamponu-2 (=1.5M Tris, pH 8,8)

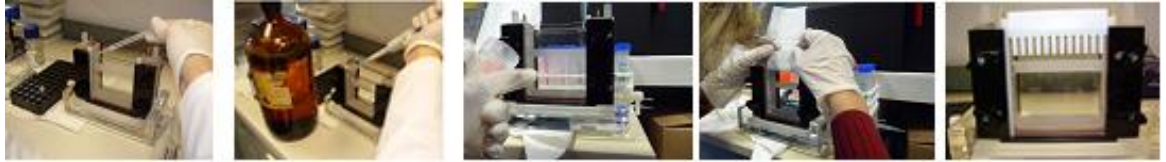
90.75g Tris bazı, 200 mL dH₂O’ya eklenir, pH’sı 8.8’e ayarlanır. İyice karıştırıp çözdükten sonra 500 ml’ye tamamlanır.

4. 10% amonyum persülfat (w/v)

Taze hazırlanmalıdır.

Malzemeler hazırlandıktan sonra jel dökme kalıbı hazırlanır. Aralarına iki ayıraç (*spacer*) yerleştirdikten sonra 2 cam kalıp düzeneğe yerleştirilir. Alttan sızıntı olmaması önemlidir, sızıntı olup olmadığı az miktarda distile su ile kontrol edilir.

Ayırıcı jel karışımı hazırlandıktan sonra, pipetle hızlıca ama dikkatli bir şekilde kenarından kalıpların arasına dökülür, bu esnada üstte kabarcık oluşmamasına dikkat edilir. Katalizörler eklendikten sonra jel solüsyonu 5-10 dakika içerisinde tamamen donmaktadır. Üst kısmın düzgün bir yüzey oluşturması için 0,5cc kadar bütanol veya izopropopranol yavaşça eklenir. Jel tamamen donduktan sonra konan alkol geri boşaltılır ve istifleyici jel hazırlanarak üzerine aynı şekilde dökülür. Döker dökmez, son olarak tarak yerleştirilerek donmaya bırakılır, böylece kuyular oluşturulmuş olunur (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Jel Zimogram için jel dökülme aşamaları görülmektedir.

3.10.4. Jelatin Zimografi Deney Protokolü

- Stok MMP2-MMP9 solüsyonu, 50 mM PBS (pH=5,5) içerisinde 50 kat seyreltilerek 10'ar μ L halinde ependorflara konuldu.
- Stok peroksinitrit, 0, 1, 10, 100, 1000 μ M'lık derişimler elde edilecek şekilde soğuk (+4°C) ve önceden degaze edilmiş (*degassed*) distile su ile seyreltildi. Suyun önceden degaze edilmesinin sebebi, normalde içinde çözünmüş olarak bulunan karbon dioksitin (CO_2), peroksinitritle reaksiyona girerek onun hızla dekompoze olmasına sebep olmasıdır.

- Daha sonra, önceden hazırlanmış dekompoze peroksinitrit 100 μM olacak şekilde seyreltilti. Dekompoze peroksinitrit (peroksinitrit yıkım ürünlerinden olan nitrit ve nitrattan oluşur), peroksinitritin pH'sı 7,4 olan 50 mM PBS'te 30 dakika bekletilmesiyle oluşturuldu. Peroksinitritin 7,4 pH'daki yarı ömrü 1 saniyenin altındadır. Bu sayede 30 dakika içinde tamamen dekompoze olur.
- 10 μL MMP2-9 solüsyonlarının her birinin üzerine 1 μL peroksinitrit (0, 1, 10, 100, 1000 μM) veya dekompoze peroksinitrit (100 μM) eklendi. Oluşan karışımın pH'sı 7,4'e ayarlandı. Ependorflar önceden 37°C'ye getirilmiş etüve konuldu. 5 dakika arayla 2 kere daha peroksinitrit ve dekompoze peroksinitrit ilgili ependorflara eklendi.
- 45 dakika enkübasyon sonrasında MMP'ler etüvden çıkartıldı ve Jelatin Zimografi aşamasına geçildi.
- 10 μL protein (MMP2-9) solüsyonu, 10 μL Tris-Glisin SDS numune tamponu (*sample buffer*) (2x) ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 20'şer μL 'lik numuneler kuyucuklara yüklendi. Jel, 1x Tris-Glisin SDS yürütme tamponu (*running buffer*) ile +4°C'de, 125 voltta, 4 saat yürütüldü.
- Yürütme tamamlandıktan sonra, jel kalıptan ayrıldı. Küçük bir kaba konulmuş renatüre edici tampon çözeltisi içinde 30 dakika sallandı. Bu sayede yürütmeden önce denatüre edilen MMP2-9 proteinleri, renatüre edilerek enzimatik aktivitelerini geri kazanmaları sağlanmaktadır.
- 30 dakika sonunda tampon çözelti dökülerek yerine geliştirici tampon (*developing buffer*) konuldu ve 30 dakika sallandı. 30 dakika sonunda tampon çözelti tazelendi ve 40 saat 37°C'de enkübe edildi. Bu sayede MMP2 ve 9'un, jel üzerindeki jelatini yıkabilmesi için optimum enzimatik koşullar sağlanmaktadır.
- 40 saatin sonunda geliştirici tampon dökülerek boyama aşamasına geçildi. Jel, uygun çözeltide hazırlanmış (Metanol/Asetik asit/Distile su: 50/10/40) *Coomassie Mavisi R-250* (Bio-Rad) (0.5% w/v) ile 30 dakika

sallandı. Daha sonra 2 saat kadar boya uzaklaştırıcı (*destaining*) tampon çözeltisi ile sallanarak bantların ortaya çıkması sağlanmış oldu.

3.10.5. Zimogram Jellerinin Görüntülenmesi

Jellerin görüntülenmesi *Kodak Gel Logic 100* sistemi ile yapıldı. Bu sistemde, karanlık bir odacık içerisindeki *Coomassie mavis*i ile boyanmış jelin içinden ultraviyole ışık geçirilir (*UV transillumination*). Geçen ışık monokrom dijital kamera ile kaydedilir. Neticede ışığın geçme miktarına göre gri değerlerinden oluşan bir görüntü oluşur. Bant bölgelerinden daha çok ışık geçebildiğinden bantlar parlak görülür. Başka bir deyişle optik yoğunlukları yüksektir.

Elde edilen görüntüler *Kodak MI Molecular Imaging v5.0* yazılımı ile dijitalize edilerek sabit sürücüye kaydedildi. Analizleri aynı yazılımla yapıldı.

3.11. İstatistiksel Analiz

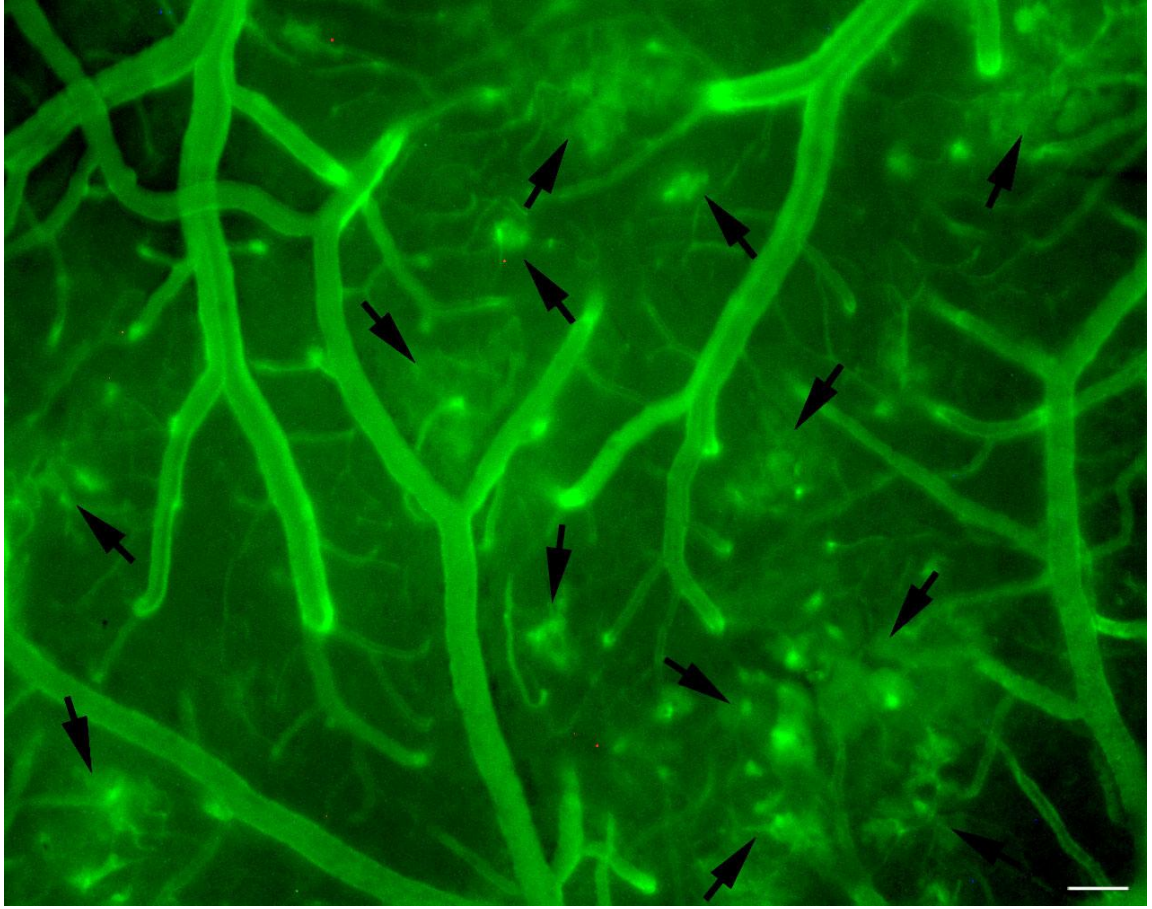
İntravital mikroskopi çalışmasının istatistiksel analizinde tedavinin etkisi *Mann-Whitney U* testi ile karşılaştırıldı. Topikal peroksinitrit uygulanan deneylerde tedavi verilmemiş kontrol ve DMSO grupları birleştirilerek ebselen tedavisi verilen grupla karşılaştırıldı. Retinal mikrodamarların çaplarında OGD ve reoksijenizasyon sonrası oluşan değişiklikler *Wilcoxon signed-rank* testi ile, tedavinin etkisi ise *Mann-Whitney U* testi ile karşılaştırıldı. $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Serebral Mikrodamarların İntravital Görüntüleme Teknikleriyle İncelendiği Çalışmanın Bulguları

4.1.1. Deney protokolünün yerleştirilmesi

İntravital görüntüleme deney düzeneğinin oturtulması ve deneylerin yapılması sırasında toplam 36 deney yapılmış, 15 deney başarılı olmuş ve çalışma gruplarına dâhil edilmiştir. Bu çalışmaların önemli bir kısmını protokolün oturtulması esnasında yapılan pilot deneyler oluşturmaktadır. Bu yöntemin en büyük zorluğu kranial pencere açılıp FITC-Dekstran ile bazal görüntüler alındıktan sonra hayvanın stereotaksiden çıkartılarak iskeminin oluşturulması ve tekrar stereotaksiye yerleştirilerek aynı alanın bulunması, bu esnada da kranial pencerenin zarar görmemesine dikkat edilmesidir. Bu güçlük, başarı oranını düşüren belirleyici faktör olmuştur. Özellikle iskeminin erken dönemlerinden itibaren ve reperfüzyon esnasında kan beyin bariyerinin bozulmasına bağlı olarak FITC-Dekstranın ekstrasvaze olması ve damar kontrastını azaltarak görüntü kalitesini kimi deney hayvanlarında ciddi şekilde etkilediği tespit edilmiştir. Ekstravazasyonun yaygın bir dağılım yerine multifokal özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Ekstravazasyonun çok şiddetli olduğu deneyler çalışmaya dâhil edilmemiştir. Kranial pencere ile çalışmanın zorluğu ise pencere açıldıktan sonra fizyolojik koşulların sürdürülebilmesidir. Bunun için ilk olarak fosfat tamponlu salin (PBS) kullanıldı ancak damar bütünlüğünün korunmadığının görülmesi üzerine ikinci olarak agar denendi. Agarla pürüzsüz bir yüzey oluşturmakta güçlük çekildiği için kaliteli görüntü almakta güçlük çekildi. Bunun üzerine pencerenin üzerinin 37°C'deki yBOS ile örtülmesine karar verildi. yBOS içeriği ve kimyasal özellikleri fare BOS'unun içeriğiyle aynı olan bir çözeltidir. Elektrofizyoloji çalışmalarında da kullanılan bu solüsyon sayesinde görüntü kalitesinden ödün vermeden fizyolojik koşullar devam ettirilebildi.

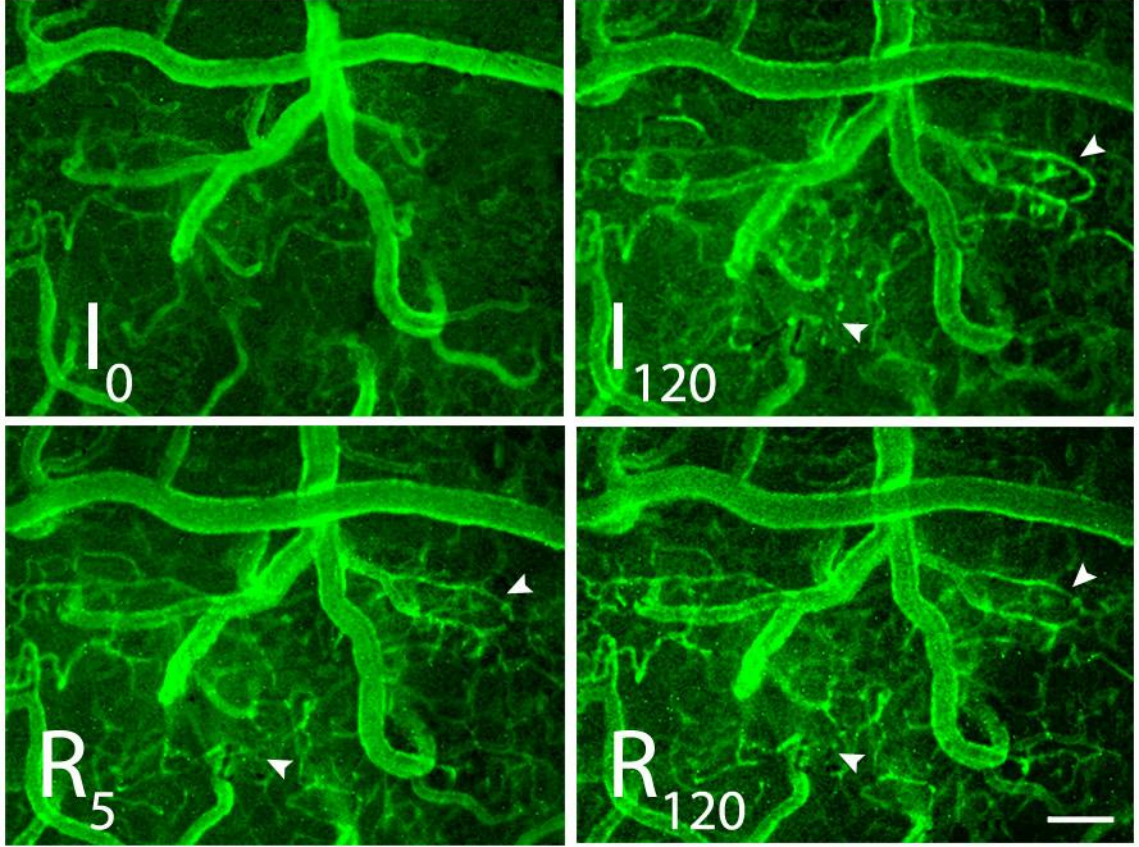


Şekil 4.1. İskeminin henüz başında kan beyin bariyerinin sızdırmasına bağlı çok sayıda ekstrasvazasyon alanları oklarla gösterilmektedir (Ölçek=100 µm).

4.1.2. İskemi/Reperfüzyon Grubu

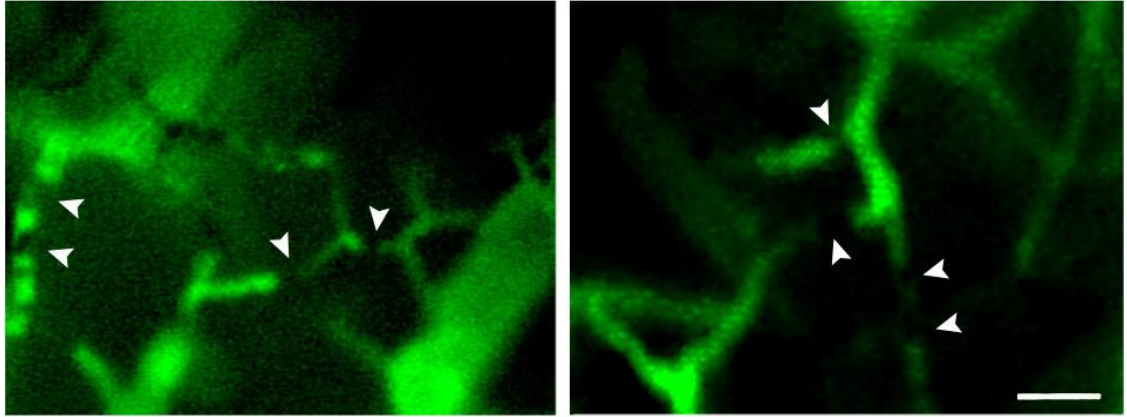
Kontrol grubunda 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon yapılarak, FITC-70S ile doldurulan makro ve mikrovasküler yataktaki değişimler takip edildi. Yapılan ön deneyler sırasında iskemiye takiben mikrosirkülasyonda birinci saatten itibaren boğumlanmaların başladığı ve ikinci saatte maksimuma ulaştığı tespit edildi. Bu nedenle deney protokolünde iskeminin ikinci saatindeki boğumlanmış damarların sayılmasına karar verildi. Benzer şekilde reperfüzyon sırasında özellikle tedavi edici ajanların etkisini iyi tespit edebilmek amacıyla reperfüzyonun ikinci saatindeki boğumlanmış damarlar sayıldı. Bu grup farelerde, iskeminin 120. dakikasında kapiller damarların 56 ± 3 'ünde boğumlanmalar tespit edilirken, bunu takip eden reperfüzyonun

120. dakikasında bu rakam 62 ± 3 'e çıktı (n=3 fare, toplam sayılan mikrodamar sayısı=555) (Şekil 4.2).



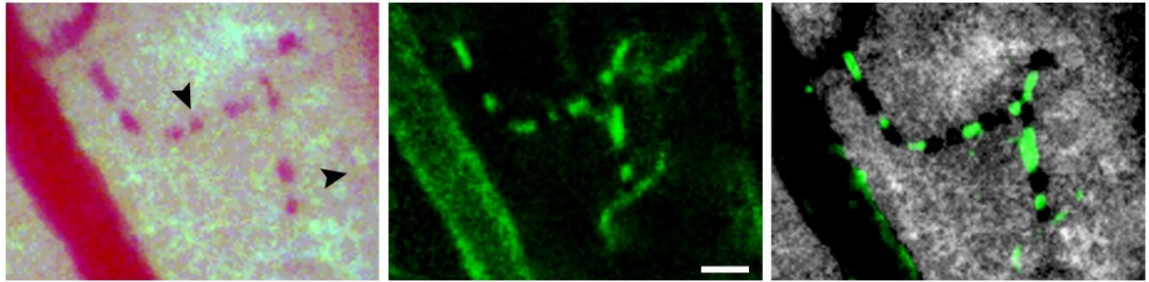
Şekil 4.2. İskemi/reperfüzyonu takiben mikrovasküler yatakta boğumlanmalar (okbaşları) görülmektedir (I, iskemi; R, reperfüzyon; rakamlar görüntülerin iskemi ve reperfüzyonun kaçınıcı dakikasında alındığını belirtmektedir, ölçek=100 μ m).

Bu boğumlanmalar gerek damar uzunluğu boyunca gerekse perisitlerin yoğun olarak bulunduğu çatallanma bölgelerinde görüldü. Boğumlanmaların gerisinde, plazma stazına bağlı olarak flüoresan maddenin daha yavaş akması nedeniyle sinyal yoğunluğunda artış tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Modifiye edilmiş mikroskopla elde edilen 100 kat büyütme görüntüde kesintili mikrodamarlar görülmektedir (okbaşları boğumlanmaları göstermektedir, ölçek=50 μ m)

Aydınlık saha görüntülerinde, bu boğumlanmaların arasında hapsolmuş eritrosit ruloları görüldü (Şekil 4.4).

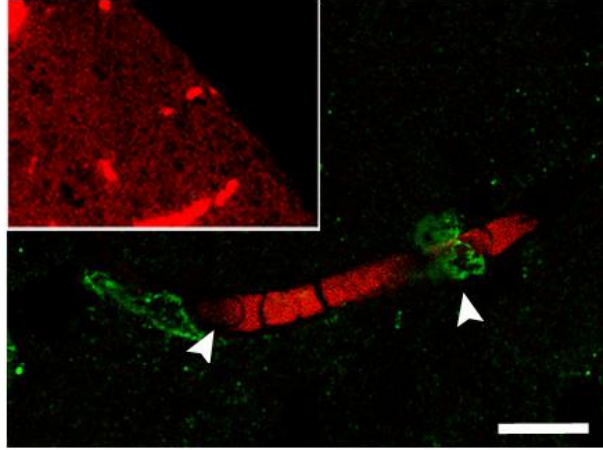


Şekil 4.4. Soldaki resimde eritrosit ruloları beyaz ışıkla alınmış görüntüde kırmızı olarak görülmektedir. Ortadaki resimde aynı alanın flüoresan ışıktaki alınmış görüntüsünde FITC-Dekstran (yeşil) taşıyan plazma görülmektedir.

Sağdaki resimde ilk resim siyah beyaza çevrilmiş ve ikincisiyle üst üste getirilmiştir. Eritrosit rulolarının takıldığı boğumlanmaları izleyen ince plazma şeritleri görülmektedir (Ölçek=30 μ m).

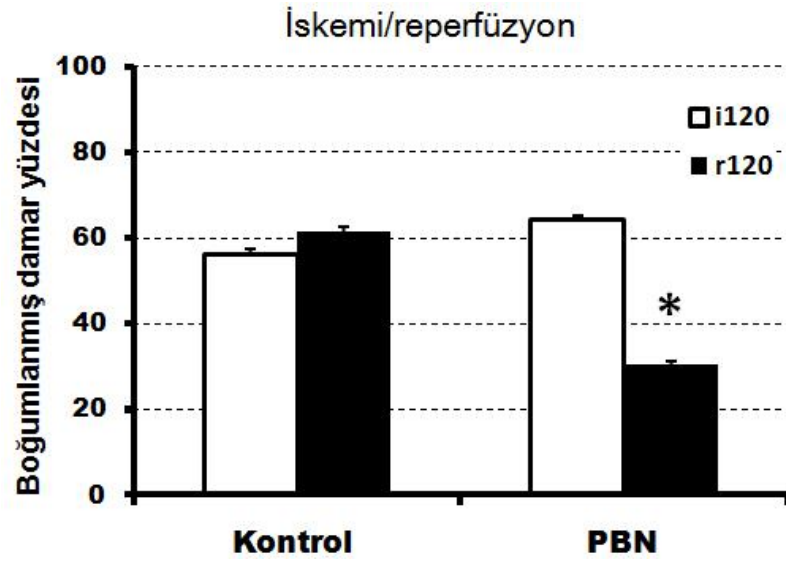
Aynı deneyin sonunda histolojik kesitler alınarak, perisitleri işaretlemek amacıyla α -SMA'ya karşı geliştirilen antikorlarla (fare, monoklonal, Neomarkers), immünflüoresan işaretleme yapıldı. Konfokal mikroskop ile

alınan görüntülerde boğumlanmaların hemen yanında perisitlerin yer aldığı görüldü (Şekil 4.5).

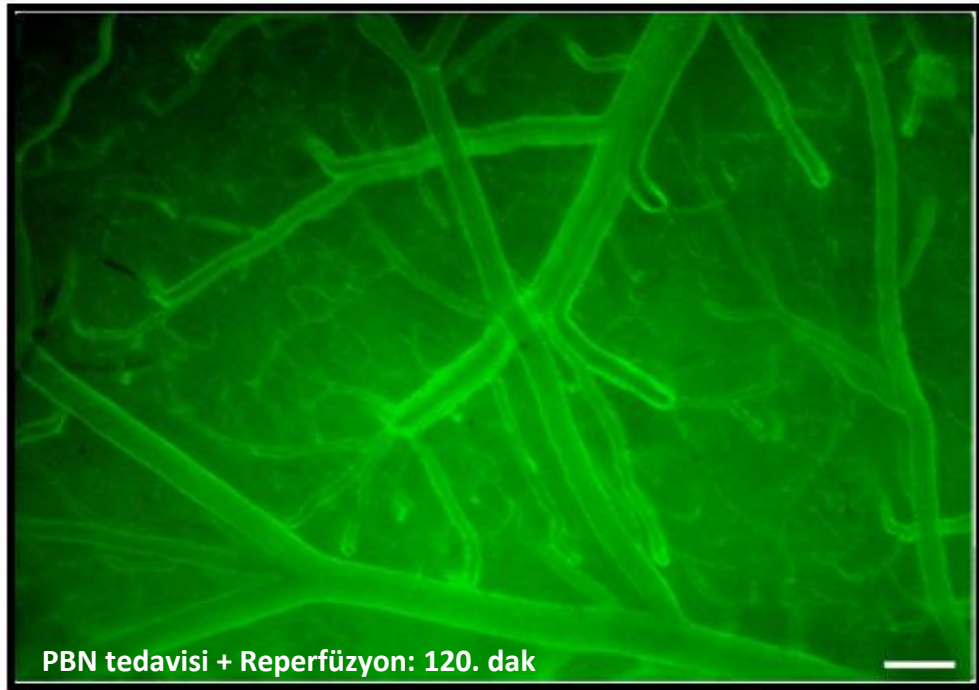
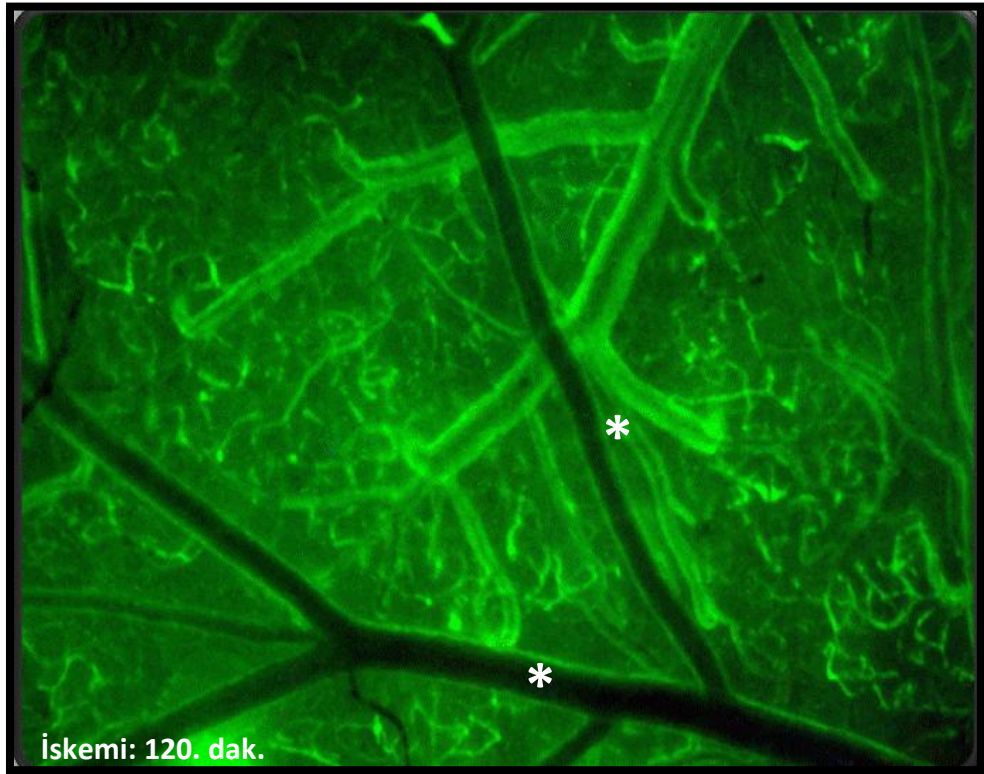


Şekil 4.5. Anti- α -SMA antikoruna ile işaretlenmiş (yeşil) perisitlerin kasılıp borohidrit ile işaretlenmiş (kırmızı) eritrositleri hapsederek kapiller kan akımını tıkaması görülmektedir. Inset: Sodyum borohidritle muamele edilmiş kortikal bir alanın flüoresan mikroskopi ile alınan görüntüsü. Şekil 4.3'teki görüntülerin alındığı korteks kesitinde korteksin derinine dalan damarlarda takılı kalmış eritrositler görülüyor. Okbaşılarıyla gösterilen yeşil renkli alanlar anti- α -SMA antikoruna ile işaretlenmiş perisitlere karşılık gelmektedir (Ölçek=10 μ m).

Reperfüzyondan 15 dakika önce PBN verilmiş olan grupta ise boğumlanmış damar oranı iskeminin 120. dakikasında 64 ± 3 iken, 2 saat reperfüzyonun ardından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalarak 30 ± 4 'e düştü ($n=3$ fare, toplam sayılan mikrodamar sayısı=620, $p<0.05$) (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.6. İskemi/reperfüzyon sonrası tedavi verilmemiş gruba, PBN tedavisi verilen grubun boğumlanma gösteren damar yüzdeleri karşılaştırılmaktadır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBN verilen grupta anlamlı fark saptanmıştır (*, $p < 0,05$). i120, iskeminin 120. dakikası; r120, reperfüzyonun 120. dakikası.

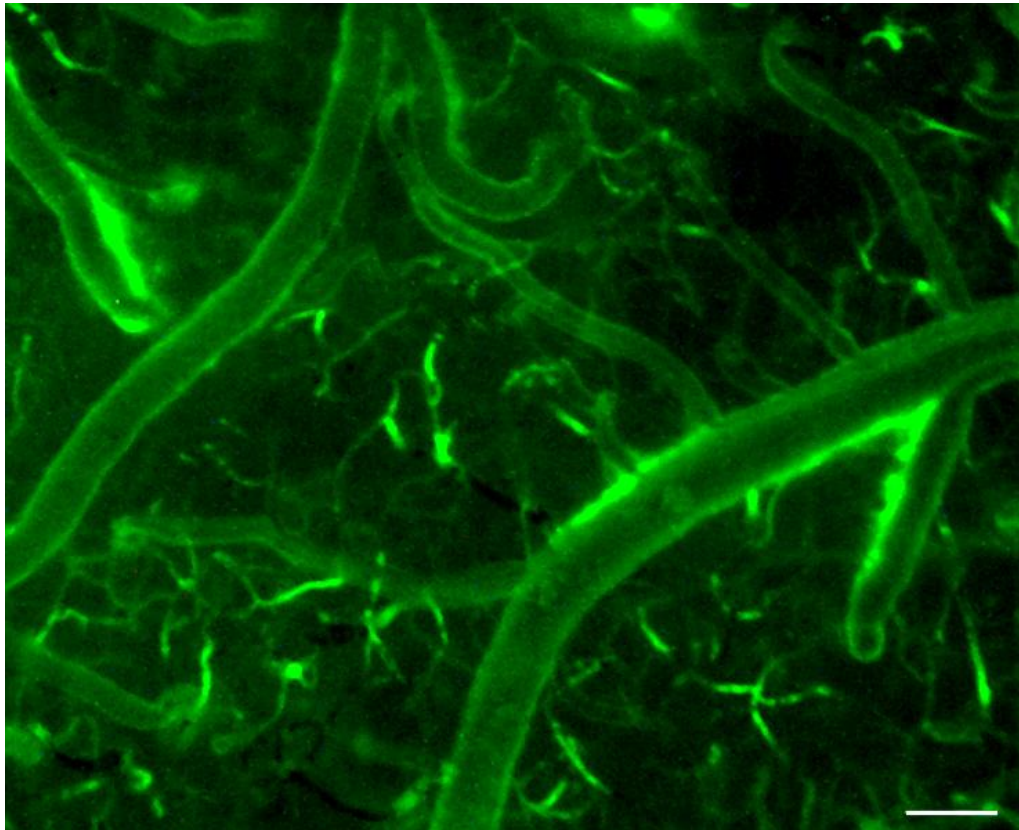


Şekil 4.7. Üst sırada yer alan resim iskemi sonrası 120 dakikayı göstermektedir. Mikrodamarların büyük bir kısmının üstünde boğumlanmalar görülmektedir, orta serebral arterin dalı yıldızla işaretlenmiştir ve içinde akım yoktur. Alt sırada ise aynı farenin reperfüzyondan 15 dakika önce verilen

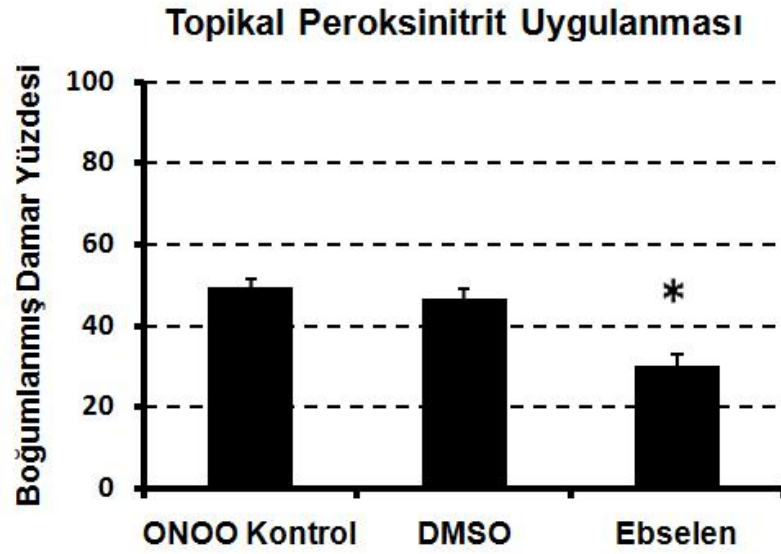
PBN tedavisinden 2 saat sonra tıkalı kapiller sayısının önemli ölçüde azalıp, mikrodolaşımın düzeldiği görülmektedir. Yıldız işaretiyle gösterilmiş olan OSA dalının reperfüzyon sonrası FITC-Dekstran ile yeniden dolduğu, yani rekanalize olduğu görülmektedir (Ölçek=100 μ m).

4.1.3. Topikal Peroksinitrit Uygulaması

Yalnızca topikal peroksinitrit uygulanan kontrol farelerde, peroksinitrit kortikal mikrodamarların 49 ± 2 'sinde ($n=4$, toplam sayılan mikrodamar sayısı=396) segmental darlıklara yol açtı (Şekil 4.8). Taşıyıcı (DMSO) verilen grupta anlamlı değişiklik gözlenmedi (47 ± 3 , $n=2$, toplam sayılan mikrodamar sayısı=252). Ebselen verilen grupta ise bu oran 30 ± 3 'e düştü ($n=4$, toplam sayılan mikrodamar sayısı=423, $p<0,05$) (Şekil 4.9).



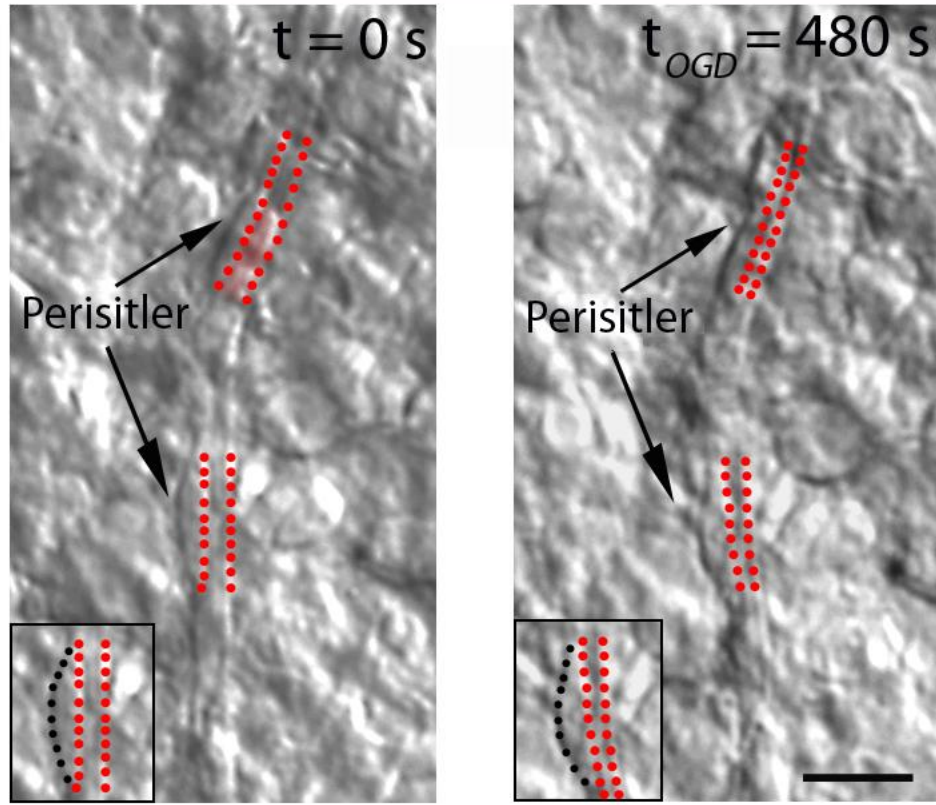
Şekil 4.8. Topikal peroksinitrit uygulanmasını takiben mikrodamarların üzerinde kesintiler ve tıkanıklıklar oluşmaktadır (Ölçek=60 μ m).



Şekil 4.9. Topikal peroksinitrit uygulanmasını takiben tedavi verilmemiş gruba, Ebselen tedavisi ve taşıyıcı verilen grubun boğumlanma gösteren damar yüzdeleri görülmektedir. Ebselen tedavisi verilen grup ile verilmeyen diğer iki grup birleştirilerek karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmaktadır (*, $p<0,05$).

4.2. İzole edilmiş Retinal Mikrodamarların *in vitro* Görüntülenmesi Çalışması Bulguları

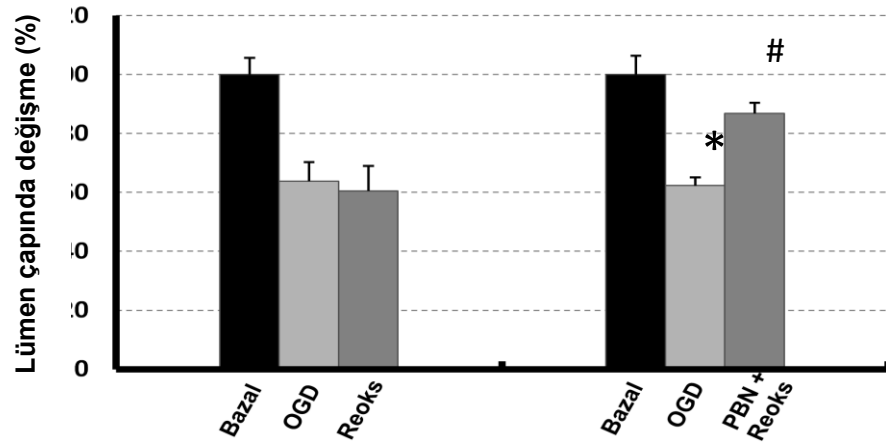
İzole edilen retinal mikrodamarlarda OGD esnasında 25 perisit canlı olarak izlenmiştir. 9 tanesi oksijen-glukoz bulundurmayan iskemik solüsyona geçildikten 420 ± 42 saniye sonra kasılarak bitişindeki lümen çapının daralmasına sebep oldu (Şekil 4.9). Bu deneyler esnasında OGD öncesi mikrodamar çapı $5,6\pm0,8$ iken OGD esnasında $3,6\pm0,7$ μm 'ye düştü, başka bir deyişle mikrodamar lümeni OGD esnasında perisit komşuluğundaki bölgede bazal değerinin 62 ± 4 'üne daraldı ($n=9$ perisit, $p<0,05$). Tekrar normoksik ve normoglisemik perfüzyon sıvısına geçilmesi sonrası düzelme olmadı ve bu oran 61 ± 9 olarak tespit edildi ($5,5\pm0,5$ μm , $n=3$ perisit).



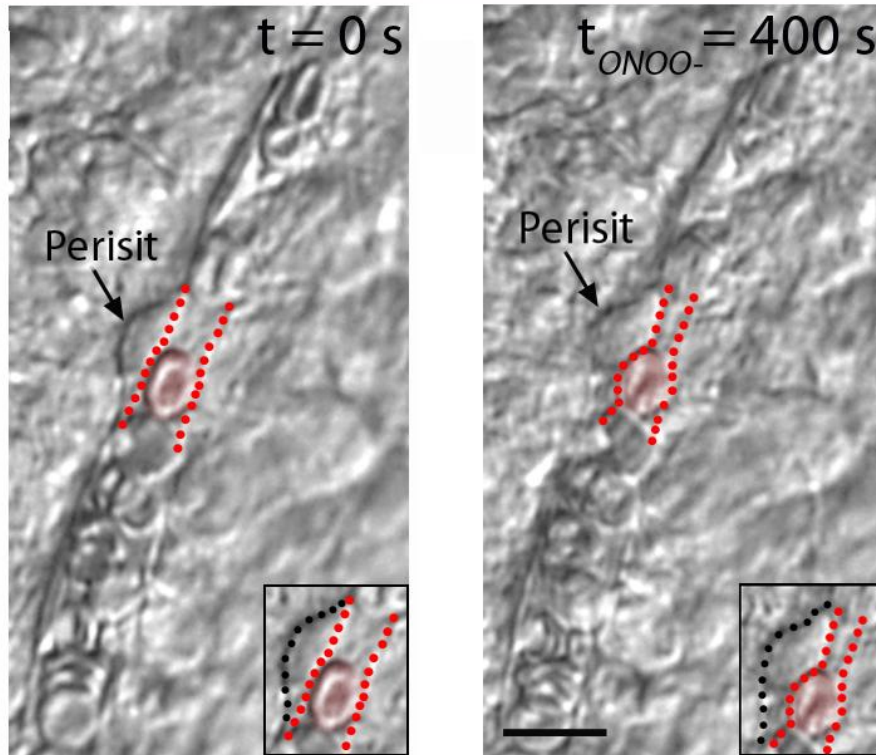
Şekil 4.10. OGD'yi takiben perisitlerin kasılarak şekil değiştirdikleri ve komşu lümen çapını daralttıkları görülmektedir (kırmızı noktalarla işaretli kısımlar kapiller lümeni göstermektedir, ölçek=10 μm).

OGD sonrası reoksijenizasyon sıvısına PBN (100 μM) eklenen grupta ise, bazal çap $4,1 \pm 0,3$ μm iken, OGD sonrası çap $2,5 \pm 0,1$ 'a, yani bazal değer $\%63 \pm 3$ 'üne düştü ($p < 0,05$). PBN ile reoksijenizasyon sonrası ise tekrar $3,5 \pm 0,2$ μm 'ye, bazal değer $\%87 \pm 4$ 'ü ne çıktı ($n=5$ perisit). Bu olay reoksijenizasyonu takiben 510 ± 75 saniye civarında gerçekleşti (Şekil 4.10).

Perfüzyon odacığındaki izole retinal mikrodamarlara peroksinitrit (30 μM) uygulanması ile perisit kontraksiyonu gerçekleşti ve lümen çapı daralarak $6,3 \pm 0,9$ μm 'den $4,4 \pm 0,7$ μm 'ye düştü ($n=5$ perisit, $p < 0,05$) (Şekil 4.11).



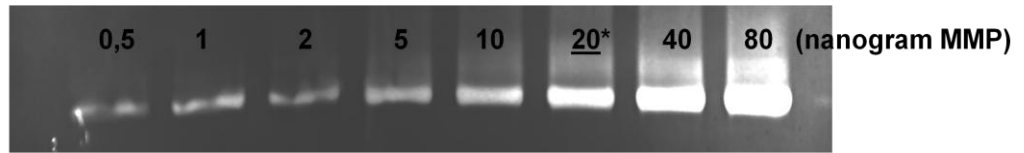
Şekil 4.11. OGD sonrası ve reoksijenizasyon sırasında, PBN tedavisi verilen ve verilmeyen grupların lümen çapı yüzde değişimleri görülmektedir. OGD sonrası mikrodamar çapı değerleri bazale göre daraldı (*, $p < 0,05$). Reoksijenizasyon sonrası değerler karşılaştırıldığında PBN verilmesinin anlamlı farka yol açtığı saptanmıştır (#, $p < 0,05$).



Şekil 4.12. Peroksinitrit uygulaması sonrası perisitlerin kasılarak şekil değiştirdikleri ve komşu lümen çapını daralttıkları görülmektedir (kırmızı noktalarla işaretli kısımlar kapiller lümeni göstermektedir, ölçek=10 μm).

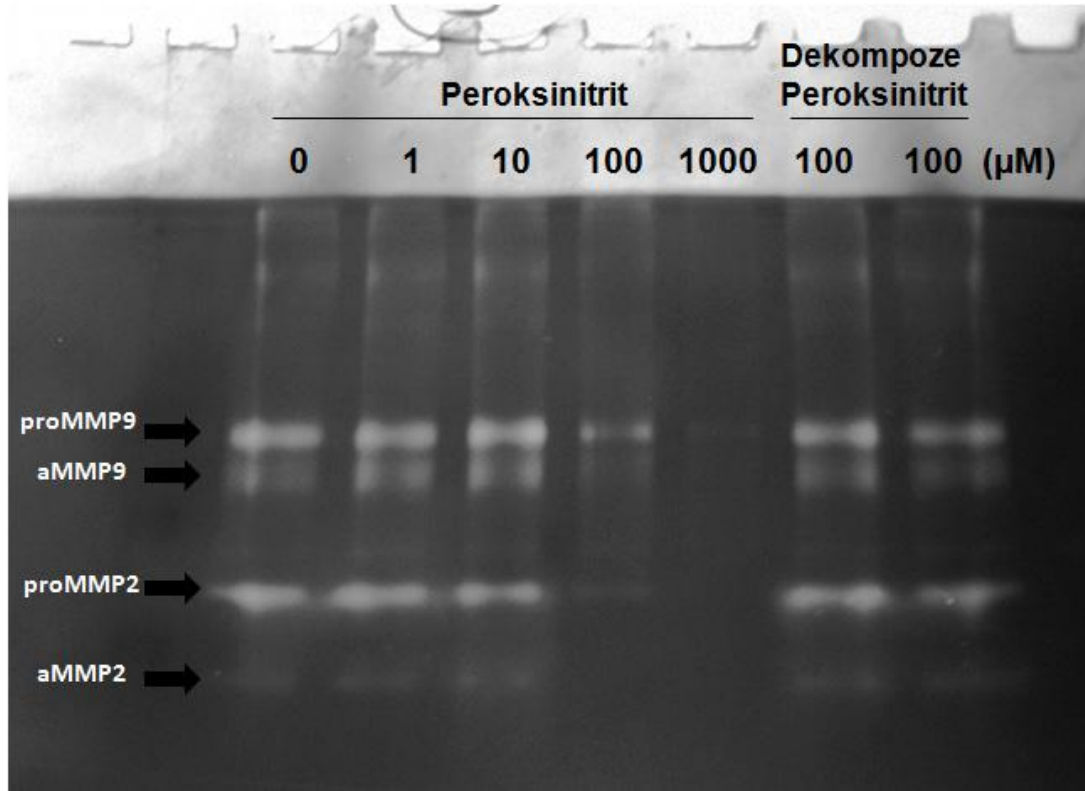
4.3. Matriks Metalloproteinazlar ile Peroksinitrit Etkileşiminin Jelatin Zimografi Yöntemiyle İncelenmesi

İlk olarak, jelatin zimografi tekniği protokolü çalışır hale getirildi ve tekrarlayan denemelerde başarılı sonuçlar alındı. Deneylerde ne kadar MMP2 ve 9 proteini kullanılacağına karar vermek için artan konsantrasyonlarda MMP2 ve 9 standart proteini kuyulara yüklendi. Yapılan denemeler sonunda 20 nanogram MMP ile diğer deneylerin yapılmasına karar verildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.13. MMP-9 standart proteinleri ile elde edilen jel zimografi görüntüsü. Resmin üstünde her kuyucuğa yüklenen pozitif kontrol protein miktarı görülmektedir. 20 ng ile protein yüklenmesi ile en iyi sonuç elde edilmiş ve MMP-9 proteinine ait aktiviteler izlenmiştir.

0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M peroksinitrit ve 100 μ M dekompoze peroksinitrit 20'şer nanogram MMP2 ve 9 standart proteini ile protokolde belirtildiği yöntemle enkübe edilerek zimografi yapıldı (n=2) ve jel görüntüleri alındı. Dekompoze peroksinitrit kontrol olarak kullanıldı. Her iki jel görüntüsü değerlendirildiğinde birbiriyle benzer bulgular tespit edildi. Deneylerden birine ait jel görüntüsü Şekil 4.12'de gösterilmektedir. 1 ve 10 μ M konsantrasyondaki peroksinitrit MMP9 aktivasyonuna sebep olmuş (aktif MMP9 bant yoğunluğu konsantrasyon ile giderek artmış), ancak yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 1000 μ M) MMP'lerin aktivitesinin belirgin ölçüde azaldığı görülmüştür. Dekompoze peroksinitrit ile düşük konsantrasyonlardaki peroksinitritin bant büyüklükleri ise benzerdir.



Şekil 4.14. Peroksinitritin yüksek konsantrasyonlarında (100 μ M ve 1000 μ M) MMP'lerin aktivitesinin belirgin ölçüde azaldığı görülmektedir. Dekompoze peroksinitrit ile düşük konsantrasyonlardaki peroksinitritin bant büyüklükleri benzer olarak görülmektedir.

TARTIŞMA

İnme tedavisinde son yıllarda kullanılmaya başlanan tPA (doku plazminojen aktivatörü) enzimi ile tıkalı arterin rekanalizasyonu yöntemi, dokuyu kurtarmaya yönelik fakat acil yaklaşım gerektiren bir tedavi olanağı sunmuştur. Ancak tPA ile de beklenenden daha az başarı elde edilmiştir. Bunun en önemli nedeni ise, özellikle gecikmiş rekanalizasyonla ortaya çıkan, reperfüzyon hasarıdır. Bu nedenle hali hazırda elimizde var olan rekanalizasyon tedavisini daha başarılı hale getirmek için reperfüzyon hasarına yönelik tedavi stratejileri geliştirmek inme araştırmalarının temel amaçlarından biridir.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada iskemik ve reperfüzyon sonrası erken dönemde mikrodamarların üzerlerinde boğumlanmaların meydana geldiği ve böylece tıkanıklıkları histolojik yöntemlerle *ex vivo* olarak incelenen beyin kesitlerinde tespit edilmişti. Elde edilen veriler, bu tıkanıklardan perisit kasılmasının sorumlu olabileceğini düşündürmektaydı. Bu tezin ana amacı ise bu bulguları *in vivo* ortamda intravital görüntüleme yöntemleri ile test etmek ve izole retina mikrodamarlarında perisit kasılmasını direkt olarak gözlemektir. Ayrıca bu deneysel düzeneklerde peroksinitritin mikrosirkülasyon ve perisitler üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Kortikal mikrosirkülasyonun intravital yöntemlerle görüntülenmesi çalışmalarının başlangıcı Rosenblum ve Zweifach'ın yaklaşık 40 yıl önceki deneylerine dayanmaktadır (82-84). Kranial pencere açılarak flüoresan boyalarla kortikal mikrodolaşımın incelenmesine ise 1990 sonrasında başlanmıştır. Dirnagl ve arkadaşları bu amaçla lazer taramalı konfokal mikroskopiye kullanırken (85, 86) Hudetz ve arkadaşları epiflüoresans videomikroskopi yöntemini kullanmışlardır (31, 87). İki yöntemin farklı üstünlükleri vardır, konfokal mikroskopi ile 250 µm derinliğe kadar inilebilirken, epiflüoresans mikroskopi ile daha geniş bir yüzey alanında, daha hızlı veri elde edilebilmektedir. Bu tezde, olabildiğince çok mikrodamar incelenmesi hedeflendiği için epiflüoresans yöntemi seçilmiştir. İntravital

görüntüleme yönteminin uzun süreli fokal iskemi ve reperfüzyon esnasında mikrodolaşımın incelenmesi amacıyla kullanılması ise oldukça yenidir ve ilk kez 2002 yılında Pinard ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (88). Epiflüoresans tekniği ile fokal iskemi ve reperfüzyon esnasında mikrodolaşımın morfolojik olarak incelenmesi ilk kez bu tez çalışmasıyla gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan intravital görüntüleme yöntemiyle, yüzeye en yakın mikrodamarlar görülebilmektedir. Stereomikroskopide kullanılmış olan 80 kat büyütme ile kapiller damarlar ayırt edilebilmektedir. Uzun süre ışığa maruz bırakılan flüoresan boyalar oksijen radikallerinin oluşumuna neden olduğu için, bu çalışmada da görüntüleme süreleri kısa tutulmuş ve sık görüntüleme yapılmasından kaçınılmıştır (89). Mikrodamar fizyolojisini koruma ve verilen flüoresan boyanın ekstrasvaze olarak görüntü kalitesini engellememesi amacıyla, kranial pencere açılması esnasında duranın ve dural damarların zedelenmemesine azami gayret gösterilmiştir. 4 saatlik uzun deney sürecinde, ketamin anestezisi kullanılan pilot deneylerde serebral ödem oluşumunun gözlenmesi üzerine, insanlarda da intrakranial basıncı arttırdığı rapor edilmiş olan ketamin anestezisi yerine, cerrahi esnasında izofluran, 4 saatlik iskemi ve reperfüzyon esnasında ürethan anestezisi kullanılmaya başlanmıştır (90-92). İskemi ve reperfüzyon sonrası erken dönemde kan beyin bariyerinin bozulmasına bağlı olarak FITC-Dekstranın ekstrasvaze olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, literatürle de uyumludur (93, 94).

2 saatlik iskemiye takiben intraluminal filamanın geri çekilmesi ile tıkalı arterde resirkülasyonun sağlandığı damara yeniden FITC dolusuyla görülebilmektedir. Bununla birlikte, 2 saat iskeminin sonunda kranial pencere alanında sayılabilen tüm kapiller damarların 56 ± 3 'ünde tıkanıklıklar olduğu tespit edilmiştir. Tıkanık damarların üzerinde bir veya daha fazla kesinti görülmektedir. Bu kesintilerin arasında FITC-Dekstran birikimine bağlı sinyal yoğunluğunda artış tespit edilmekte ve bu mikrodamarlar belirgin hale gelmektedir. Aydınlık saha görüntüleriyle üst üste getirildiğinde, bu kesintiler eritrositlere karşılık gelmekte, aralarında ise plazma bulunduğu görülmektedir. 2 saatlik reperfüzyonun sonunda bu oran artarak 62 ± 3 'e

çıkılmıştır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada histolojik kesitlerde yukarıdaki bulgulara benzer bir şekilde, mikrodamarlar üzerinde çok sayıda boğumlanmalar görülmüş ve bu boğumlanmaların komşuluklarında perisitlerin bulunduğu tespit edilmişti. Başka bir çalışmada da, 90 dakika iskemi sonrası histolojik kesitlerde mikrodamarların içerisinde hapsolmuş eritrositlerin saptandığı bildirilmiştir (79). Bütün bu veriler bir arada değerlendirildiğinde, iskemi ve reperfüzyon sonrasında mikrodamarlar üzerinde boğumlanmalar oluştuğu ve eritrositlerin bu boğumlanmalar içinde hapsolarak mikrodolaşımda tıkanıklıklara sebep olduğu sonucuna varılmış ve bu boğumlanmaların perisitlerle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Önceki çalışmalarda fokal iskemi sonrası tıkalı damarın açılmasına rağmen iskemik bölgedeki mikrodamarların bazılarında kan akımının sağlanamadığı tespit edilmiştir (1, 2). Bu olaya “*no-reflow*” fenomeni adı verilmektedir. Bu durumun lökositlerin, trombositlerin ve fibrininin aktive olarak endotel yüzeyine tutunmasına bağlı olabileceği öne sürülmüştür (4). Bazı çalışmalarda ise iskemi sonrası kapiller çapın anlamlı derecede daraldığı bildirilmiştir (3, 54). Bu daralmanın aktif mi yoksa pasif olarak mı gerçekleştiği tartışma konusu olmuştur. Pasif daralmayı destekleyen çalışmalarda endotel hücrelerinin ve astrosit son ayaklarının iskemi sonrası şişmesi (3) veya prekapiller arteriollerin kasılması (95) sorumlu tutulmuştur. Aktif daralmayı destekleyen çalışmalar arasında endotel hücrelerinin kasılabileceğini öne süren çalışmaların (96) yanı sıra perisitlerin sorumlu olabileceğini öne süren az sayıda çalışma da (97, 98) bulunmaktadır.

Mevcut çalışmada kapiller çap ölçümü yapılamamıştır çünkü kullanılan mikroskopun büyütme sınırı olan 80 katlık büyüme oranı böyle bir ölçüm için yetersiz kalmaktadır. Bahsedilen diğer çalışmalarda 200 veya 400 kat büyütme oranı kullanılmıştır. İzole retinal mikrodamarlar üzerinde yapılan çalışmada mikrodamarlar 400 kat büyütme altında direkt olarak gözlenerek çap ölçümleri yapılmıştır.

İskemi/reperfüzyon sonrası mikrosirkülasyondaki değişikliklerle ilgili eski bir tartışma anatomik kapiller rezervin var olup olmadığıdır. Konfokal mikroskopi ile yapılan direkt gözleme dayalı pek çok çalışmada fizyolojik

koşullarda bütün mikrodamarların perfüze olduğunu gösterilmiştir (99). İskemi/reperfüzyon çalışmalarında da iskemi sonrası yeni damar açılımı (kapiller *recruitment*) tespit edilmemiştir, yani yalnız iskemik koşullarda açılan bir kapiller rezervden bahsedilemez (88). Ancak mikrodamarların %3-10 kadarı herhangi bir anda yalnızca plazma bulundurmaktadır (*plasma skimming*) (31, 99). Ayrıca nöronal aktivasyon bölgelerinde perisitlerin gevşeyerek plazma ve eritrosit akımı artışına yol açtığı gösterilmiştir (7). Bu bulgular anatomik rezerv bulunmasa da fonksiyonel bir rezervden bahsedilebileceğini göstermektedir. Bu rezervin yönlendirilmesinde gerçek kapillerlerden farklı otoregülasyon özelliklerine sahip geçit (*thoroughfare*) kanalları rol oynuyor olabilir. Bu kanallar prekapiller arteriolo-venöz anastomozlardır. Benzer şekilde, iskemi ve reperfüzyon sırasında kanın geçit kanallarından hipoperfüze durumdaki kapillerlere yönlendirilebileceği öne sürülmüştür (31). Ancak, kapiller damarların tıkanıp durumlarda aynı kanallar, kanın direkt olarak venöz sisteme aktarılmasında rol oynayabilirler. Böylece, Lazer Doppler akımölçerle kan akımı normal seviyelerde tespit edilmesine rağmen, gerçek kapillerlerde kan akımı gerçekleşmiyor olabilir.

Boğumlanmaların perisitlerin kasılmasıyla ilişkili olabileceği hipotezini test etmek amacıyla bol miktarda perisit bulundurdıkları bilinen retinal mikrodamarlar izole edilerek OGD ve peroksinitritin mikrodamarlar üzerindeki etkileri direkt olarak gözlenmiştir. Retinal mikrodamarların izole edilerek video kaydı ile perisitlerin çalışılması yöntemi Sakagami ve arkadaşlarının 1999'daki çalışmalarına dayanmaktadır. Mevcut çalışmada, ilk olarak Swiss albino farelerde retinal izolasyon yapılmaya çalışıldı ancak pigment epiteli içermeyen bu hayvanlarda dokular arası ayrımı yapmakta zorlanılması üzerine SV-129 farelere geçildi. Bu çalışmanın güçlüğü, izole edilmiş mikrodamarların canlılıklarını korumasını sağlama aşamasındandır. Fizyolojik koşulların korunmasına dikkat edilerek yapılan deneylerde, OGD sonrasında gözlenen 25 perisitinin 9'u kasılarak lümen çapında daralmaya sebep oldu. Peppiatt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu oran 4/38 olarak bulunmuştur. Görece düşük oranların sebebi, perisit hücrelerinin kasılma özellikleri arasındaki farklılıklar veya bu hücrelerin bir kısmının canlılıklarını

yitirmiş olması olabilir. OGD sonrası reoksijenizasyon lümen çapında değişikliğe sebep olmazken, reoksijenizasyon solüsyonun PBN eklenmesi mikrodamar çaplarında anlamlı bir artışa yol açmıştır. Perisit hücrelerinin asetilkolin, anjiyotensin, ATP, laktat gibi çeşitli uyaranlara cevaben şekil değiştirerek kasıldıkları önceki çalışmalarda da gösterilmişti (100-103). Bu çalışmada ilk defa peroksinitrit uygulanmasını takiben perisitlerin kasılarak komşu mikrodamar lümenini daralttıkları gösterilmiştir. Bu bulgular iskemi ve reperfüzyon sonrasında perisitlerin kasılarak mikrodamar çapında daralmaya yol açtıklarını bu kasılmanın mekanizmasında peroksinitritin rolü olabileceğini direkt olarak göstermektedir.

Kortikal mikrodamarların üzerlerine peroksinitrit uygulanması ile mikrodolaşımda tıkanıklıklar görülmesi ve izole retinal mikrodamarların üzerilerine direkt peroksinitrit uygulanmasının perisitlerde kasılmaya yol açarak mikrodamar lümeninde daralmaya yol açması, iskemi ve reperfüzyon sonrası mikrodolaşımda bol miktarda oluşan peroksinitritin perisitlerin kasılmasına katkıda bulunarak mikrodamarların eritrositler tarafından tıkanmasına yol açabileceklerini düşündürmektedir.

Perisitlerin kasılarak kapiller çapı daraltması Poiseuille yasası gereği kan akımına karşı direnci arttırmakta ve de kanın reolojik özelliklerini bozmaktadır. Fåhræus-Lindqvist etkisine göre damar çapı azaldıkça viskozite de azalmaktadır. Ancak yaklaşık 5 µm'nin altında bu durum tersine dönerek viskozitede hızlı bir artışa neden olur. Bu faktörler eritrositlerin mikrodamarlar içerisinde hapsolmesine ve trombosit ve fibrinle birlikte kümelenme oluşturmaya yol açabilir (104). Fåhræus-Lindqvist etkisindeki bu tersine dönüşün sebebi peroksinitrit nedeniyle eritrosit elastikiyetinin bozulmuş olması veya eritrositlerin etrafında yer alan ince endotel yüzey tabakasının 60 dakikalık iskemi ve takip eden reperfüzyon sırasında kalınlığının zamanla azalıyor olması olabilir (58).

Bir kapillerden birim zamanda geçen eritrosit sayısı, başka bir deyişle eritrosit akımı (*flux*), dokuya ulaştırılan oksijen miktarının en önemli göstergesidir (105). OSA tıkanmasını takiben yüzeyel arteriollerde kan akımının yeniden düzenlendiği, kimi damarlarda kan akımının tersine

döndüğü bilinmektedir (27). Bu yeniden düzenlenmenin amacı intrakortikal arteriollerde ve kapillerlerde optimum kan akımının sürdürülmesidir. OSA tıkanması sırasında kapiller damarlardaki kan akımının gerek hız gerekse akım yönü açısından tahmin edilemez olduğu bildirilmiştir (88). Peri-enfarkt depolarizasyonları gibi olaylar neticesinde hem arterioller hem de kapiller kan akımının hızı ve yönü değişebilmekte ve mikrodolaşımda gerek uzaysal gerekse zamansal olarak heterojeniteye yol açmaktadır. Bir kapillerden geçen eritrosit miktarının mikrodolaşımdaki tıkanıklıklara veya diğer sebeplere bağlı olarak azalması veya bir kapillerden yalnızca plazma geçiyor olması o bölgeye ulaşan oksijen miktarının azaldığına işaret eder. Buna rağmen, plazma akımının dolayısıyla dokuya glukoz sunumunun devam ediyor olması, o bölgede anaerob enerji üretiminde artışa ve böylece o bölgede laktat birikimine ve asiditede artışa neden olabilir. Bu durum iskemik penumbranın farklı alanlarında tespit edilen pH değişikliklerinin yamalı dağılımından sorumlu olabilir (106).

Mikrodolaşımda meydana gelen tıkanıklıkların oksidatif-nitratif hasarı azaltıcı etki gösteren PBN ve ebselen gibi ajanlarla geri çevrilebilir olması bu hasarın oluşumunda iskemi sonrası mikrovasküler yatakta yüksek konsantrasyonda oluşan peroksinitritin katkısı olduğunu düşündürmektedir. Peroksinitritin bir diğer etkisi de tirozin nitrasyonunu ile MMP aktivasyonuna yol açmak olabilir. MMP-9'un iskemi ve reperfüzyon sonrası aktive olarak KBB hasarına katkıda bulunduğu bilinmektedir (11). Daha önce yapılan bir çalışmada S-nitrozilasyon nedeni ile NO'nun MMP-9 aktivasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (14). Bu tezin bir amacı da in vitro koşullarda rekombinan MMP-9 ve MMP-2 ile peroksinitritin uygun koşullarda inkübe edilerek aktive olup olmayacağının tespit edilmesidir. Elde olunan veriler ön veri düzeyinde olup, peroksinitritin MMP-9 aktivasyonuna konsantrasyona bağımlı olarak neden olabileceğini ancak çok yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici etkisi olduğunu telkin etmektedir. Gelecek dönemlerde bununla ilgili daha detaylı deneylerin yapılması planlanmaktadır.

Sonuç olarak, mikrosirkülasyonun intravital yöntemlerle incelenmesi ile elde ettiğimiz veriler ışığında tıkalı arter açılrsa bile, iskemi sırasında

mikrodolaşımda tıkanıklıkların oluştuğu ve bunların reperfüzyon sırasında da devam ettiği sonucuna ulaşılmıştır. İzole retinal mikrodamarlarda yapılan çalışmalar OGD sonrası veya peroksinitrit uygulaması ile perisitlerin kasılarak lümen çapını daraltabildiğini göstermiştir. Kasılmış perisitler arasında hapsolmuş eritrosit kümeleri ve muhtemelen trombositler ve fibrin mikrodolaşımdaki tıkanıklıklara sebep olmaktadır. PBN ve ebselen tedavileri ile bu bulguları tersine çevrilebilmektedir. Peroksinitrit mikrodolaşımdaki tıkanıklıkların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. KBB iskemi ve reperfüzyon sonrası ilk 2 saatte açılmakta ve FITC-Dekstran 70S sızıntısına yol açmaktadır. Perisit disfonksiyonunu engelleyecek ve mikrovasküler ağı koruyacak tedavi yöntemleri trombolitiklerin yanı sıra nöroprotektif ajanların da başarı şansını arttırabilir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada ulaşılan sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Tıkalı arter açılrsa bile, iskemi sırasında mikrodolaşımda tıkanıklıklar oluşmaktadır ve bunlar reperfüzyon sırasında da devam etmektedirler.
- 2) İzole retinal mikrodamarlarda OGD sonrası veya peroksinitrit uygulaması ile perisitler kasılarak lümen çapını daraltmaktadırlar.
- 3) Kasılmış perisitler arasında hapsolmuş eritrosit kümeleri mikrodolaşımın tıkanmasına neden olmaktadır.
- 4) Peroksinitrit mikrodolaşımdaki tıkanıklıkların oluşumuna katkıda bulunmaktadır.
- 5) Peroksinitrit oluşumunu önleyici etkisi olan PBN ve ebselen tedavileri ile mikrodolaşımdaki tıkanıklıklar ve perisit kasılması geri çevrilebilmektedir.

KAYNAKÇA

1. Little, J.R., Kerr, F.W. ve Sundt, T.M., Jr. (1975). Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia. Relationship to neuronal alterations. *Mayo Clinic Proceedings*, 50(5), 264-70.
2. del Zoppo, G.J., Schmid-Schonbein, G.W., Mori, E., Copeland, B.R. ve Chang, C.M. (1991). Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*, 22(10), 1276-83.
3. Fischer, E.G., Ames, A., 3rd, Hedley-Whyte, E.T. ve O'Gorman, S. (1977). Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon". *Stroke*, 8(1), 36-9.
4. del Zoppo, G.J. ve Mabuchi, T. (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(8), 879-94.
5. Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Chen, S. ve Lian, J. (1994). Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *American Journal of Pathology*, 145(3), 728-40.
6. Yemişçi, M. (2006). *İskemi / Reperfüzyon Sonrası Kan Beyin Bariyeri Bozulmasının Mekanizmalarının Mikrodolaşımda Astrosit Son Ayakları Ve Endotel Düzeyinde İncelenmesi*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
7. Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P. ve Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700-4.
8. Chong, Z.Z., Li, F. ve Maiese, K. (2005). Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*, 75(3), 207-46.

9. Gürsoy-Özdemir, Y., Bolay, H., Sarıbaş, O. ve Dalkara, T. (2000). Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 31(8), 1974-80; tartışma 1981.
10. Gürsoy-Özdemir, Y., Can, A. ve Dalkara, T. (2004). Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 35(6), 1449-53.
11. Fujimura, M., Gasche, Y., Morita-Fujimura, Y., Massengale, J., Kawase, M. ve Chan, P.H. (1999). Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Research*, 842(1), 92-100.
12. Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W. ve Rosenberg, G.A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), 697-709.
13. Chang, D.I., Hosomi, N., Lucero, J., Heo, J.H., Abumiya, T., Mazar, A.P. ve diğerleri. (2003). Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(12), 1408-19.
14. Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A. ve diğerleri. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*, 297(5584), 1186-90.
15. Duvernoy, H.M., Delon, S. ve Vannson, J.L. (1981). Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Research Bulletin*, 7(5), 519-79.
16. Nonaka, H., Akima, M., Nagayama, T., Hatori, T., Zhang, Z. ve Ihara, F. (2003). Microvasculature of the human cerebral meninges. *Neuropathology*, 23(2), 129-35.

17. Reina-De La Torre, F., Rodriguez-Baeza, A. ve Sahuquillo-Barris, J. (1998). Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: a scanning electron microscope study. *Anatomical Record*, 251(1), 87-96.
18. Brozici, M., van der Zwan, A. ve Hillen, B. (2003). Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: a review. *Stroke*, 34(11), 2750-62.
19. Kulik, T., Kusano, Y., Aronhime, S., Sandler, A.L. ve Winn, H.R. (2008). Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain. *Neuropharmacology*, 55(3), 281-8.
20. Cavaglia, M., Dombrowski, S.M., Drazba, J., Vasanji, A., Bokesch, P.M. ve Janigro, D. (2001). Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Research*, 910(1-2), 81-93.
21. Ohtake, M., Morino, S., Kaidoh, T. ve Inoue, T. (2004). Three-dimensional structural changes in cerebral microvessels after transient focal cerebral ischemia in rats: scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Neuropathology*, 24(3), 219-27.
22. Rodriguez-Baeza, A., Reina-De La Torre, F., Ortega-Sanchez, M. ve Sahuquillo-Barris, J. (1998). Perivascular structures in corrosion casts of the human central nervous system: a confocal laser and scanning electron microscope study. *Anatomical Record*, 252(2), 176-84.
23. Cassot, F., Lauwers, F., Fouard, C., Prohaska, S. ve Lauwers-Cances, V. (2006). A novel three-dimensional computer-assisted method for a quantitative study of microvascular networks of the human cerebral cortex. *Microcirculation*, 13(1), 1-18.
24. Lauwers, F., Cassot, F., Lauwers-Cances, V., Puwanarajah, P. ve Duvernoy, H. (2008). Morphometry of the human cerebral cortex microcirculation: general characteristics and space-related profiles. *Neuroimage*, 39(3), 936-48.

25. Nishimura, N., Schaffer, C.B., Friedman, B., Lyden, P.D. ve Kleinfeld, D. (2007). Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104(1), 365-70.
26. Motti, E.D., Imhof, H.G. ve Yaşargil, M.G. (1986). The terminal vascular bed in the superficial cortex of the rat. An SEM study of corrosion casts. *Journal of Neurosurgery*, 65(6), 834-46.
27. Schaffer, C.B., Friedman, B., Nishimura, N., Schroeder, L.F., Tsai, P.S., Ebner, F.F.ve diğerleri. (2006). Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *Public Library of Science Biology*, 4(2), e22.
28. Nakai, K., Imai, H., Kamei, I., Itakura, T., Komari, N., Kimura, H. ve diğerleri. (1981). Microangioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular "sphincters". Scanning electron microscopic and dark field microscopic study. *Stroke*, 12(5), 653-9.
29. Li, J.K.J. (2004). *Dynamics of the vascular system* [Elektronik Sürüm]. River Edge, NJ, London, World Scientific Publishing Co. xii, 257 p.
30. Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 347-60.
31. Hudetz, A.G. (1997). Blood flow in the cerebral capillary network: a review emphasizing observations with intravital microscopy. *Microcirculation*, 4(2), 233-52.
32. Allt, G. ve Lawrenson, J.G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 169(1), 1-11.
33. Balabanov, R. ve Dore-Duffy, P. (1998). Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience Research*, 53(6), 637-44.
34. Puro, D.G. (2007). Physiology and pathobiology of the pericyte-containing retinal microvasculature: new developments. *Microcirculation*, 14(1), 1-10.

35. Fisher, M. (2009). Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke*, 40(3 Suppl), S13-5.
36. Armulik, A., Abramsson, A. ve Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circulation Research*, 97(6), 512-23.
37. Chakravarthy, U. ve Gardiner, T.A. (1999). Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(4), 511-27.
38. Murfee, W.L., Skalak, T.C. ve Peirce, S.M. (2005). Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels: identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation*, 12(2), 151-60.
39. Mitchell, T.S., Bradley, J., Robinson, G.S., Shima, D.T. ve Ng, Y.S. (2008). RGS5 expression is a quantitative measure of pericyte coverage of blood vessels. *Angiogenesis*, 11(2), 141-51.
40. Takahashi, A., Park, H.K., Melgar, M.A., Alcocer, L., Pinto, J., Lenzi, T. ve diğ erleri. (1997). Cerebral cortex blood flow and vascular smooth muscle contractility in a rat model of ischemia: a correlative laser Doppler flowmetric and scanning electron microscopic study. *Acta Neuropathologica*, 93(4), 354-68.
41. Sims, D.E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue and Cell*, 18(2), 153-74.
42. Kelley, C., D'Amore, P., Hechtman, H.B. ve Shepro, D. (1987). Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *Journal of Cell Biology*, 104(3), 483-90.
43. Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J.G., Reid, A.R., De Silva, S. ve Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytology*, 30(1), 35-44.
44. Hamel, E. (2006). Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *Journal of Applied Physiology*, 100(3), 1059-64.

45. Hirschi, K.K. ve D'Amore, P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 32(4), 687-98.
46. Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P. ve Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242-5.
47. Broadwell, R.D. ve Salcman, M. (1981). Expanding the definition of the blood-brain barrier to protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78(12), 7820-4.
48. Risau, W., Dingler, A., Albrecht, U., Dehouck, M.P. ve Cecchelli, R. (1992). Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *Journal of Neurochemistry*, 58(2), 667-72.
49. Kunz, J., Krause, D., Kremer, M. ve Dermietzel, R. (1994). The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *Journal of Neurochemistry*, 62(6), 2375-86.
50. Viscosity. (t.y.) Erişim: 25 Ekim 2009, <http://en.wikipedia.org/wiki/Viscosity>.
51. Lipowsky, H.H. (2005). Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*, 12(1), 5-15.
52. Baskurt, O.K. ve Meiselman, H.J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 29(5), 435-50.
53. Pries, A.R. ve Secomb, T.W. (2003). Rheology of the microcirculation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 29(3-4), 143-8.
54. McHedlishvili, G., Varazashvili, M., Mamaladze, A. ve Momtselidze, N. (1997). Blood flow structuring and its alterations in capillaries of the cerebral cortex. *Microvascular Research*, 53(3), 201-10.
55. Johnson, A.P. (2005). Microcirculation and hemorheology. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 37, 43-69.

56. House, S.D. ve Lipowsky, H.H. (1987). Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvascular Research*, 34(3), 363-79.
57. Desjardins, C. ve Duling, B.R. (1990). Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *American Journal of Physiology*, 258(3 Pt 2), H647-54.
58. Mulivor, A.W. ve Lipowsky, H.H. (2002). Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(4), H1282-91.
59. Secomb, T.W., Hsu, R. ve Pries, A.R. (2002). Blood flow and red blood cell deformation in nonuniform capillaries: effects of the endothelial surface layer. *Microcirculation*, 9(3), 189-96.
60. Damiano, E.R. (1998). The effect of the endothelial-cell glycocalyx on the motion of red blood cells through capillaries. *Microvascular Research*, 55(1), 77-91.
61. Ballabh, P., Braun, A. ve Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Diseases*, 16(1), 1-13.
62. Nagasawa, K., Chiba, H., Fujita, H., Kojima, T., Saito, T., Endo, T. ve diğçerleri. (2006). Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *Journal of Cell Physiology*, 208(1), 123-32.
63. Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.
64. Oldendorf, W.H., Cornford, M.E. ve Brown, W.J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurology*, 1(5), 409-17.
65. Lawrenson, J.G., Reid, A.R., Finn, T.M., Orte, C. ve Allt, G. (1999). Cerebral and pial microvessels: differential expression of gamma-

glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Anatomy and Embryology (Berlin)*, 199(1), 29-34.

66. Brain Endothelial Research, t.y. Erişim: 25 Aralık 2009, home.szbk.u-szeged.hu/~krizbai/capillary-s.png.
67. Yong, V.W. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), 931-44.
68. Rosenberg, G.A. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 39(3), 279-91.
69. Leber, T.M. ve Balkwill, F.R. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249(1), 24-8.
70. Lafleur, M.A., Handsley, M.M. ve Edwards, D.R. (2003). Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Review of Molecular Medicine*, 5(23), 1-39.
71. Mun-Bryce, S. ve Rosenberg, G.A. (1998). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(11), 1163-72.
72. Goldstein, S. ve Merenyi, G. (2008). The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity. *Methods in Enzymology*, 436, 49-61.
73. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. ve Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal Biological Chemistry*, 266(7), 4244-50.
74. Pacher, P., Beckman, J.S. ve Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Reviews*, 87(1), 315-424.
75. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. ve Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite:

implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87(4), 1620-4.

76. Beckman, J.S. (1994). Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 69-75.
77. Abello, N., Kerstjens, H.A., Postma, D.S. ve Bischoff, R. (2009). Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3222-38.
78. Wang-Fischer, Y. (2009). *Manual of stroke models in rats*. Boca Raton, CRC Press.
79. Liu, S., Connor, J., Peterson, S., Shuttleworth, C.W. ve Liu, K.J. (2002). Direct visualization of trapped erythrocytes in rat brain after focal ischemia and reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(10), 1222-30.
80. Gelatin Zymography Protocol. t.y. Erişim: 20 Ekim 2009, <http://www.millipore.com/techpublications/tech1/mcproto009>.
81. Robinson, K.M. ve Beckman, J.S. (2005). Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, 396, 207-14.
82. Rosenblum, W.I. (1971). Effects of reduced hematocrit on erythrocyte velocity and fluorescein transit time in the cerebral microcirculation of the mouse. *Circulatory Research*, 29(1), 96-103.
83. Rosenblum, W.I. ve Zweifach, B.W. (1963). Cerebral Microcirculation in the Mouse Brain. Spontaneous and Drug-Induced Changes in Flow and Vascular Diameter. *Archives of Neurology*, 9, 414-23.

84. Rosenblum, W.I. (1969). Erythrocyte velocity and a velocity pulse in minute blood vessels on the surface of the mouse brain. *Circulatory Research*, 24(6), 887-92.
85. Dirnagl, U., Villringer, A., Gebhardt, R., Haberl, R.L., Schmiedek, P. ve Einhaupl, K.M. (1991). Three-dimensional reconstruction of the rat brain cortical microcirculation in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(3), 353-60.
86. Dirnagl, U., Villringer, A. ve Einhaupl, K.M. (1992). In-vivo confocal scanning laser microscopy of the cerebral microcirculation. *Journal of Microscopy*, 165(Pt 1), 147-57.
87. Hudetz, A.G., Feher, G., Weigle, C.G., Knuese, D.E. ve Kampine, J.P. (1995). Video microscopy of cerebrocortical capillary flow: response to hypotension and intracranial hypertension. *American Journal of Physiology*, 268(6 Pt 2), H2202-10.
88. Pinard, E., Nallet, H., MacKenzie, E.T., Seylaz, J. ve Roussel, S. (2002). Penumbra microcirculatory changes associated with peri-infarct depolarizations in the rat. *Stroke*, 33(2), 606-12.
89. Dixit, R. ve Cyr, R. (2003). Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *The Plant Journal*, 36(2), 280-90.
90. Reicher, D., Bhalla, P. ve Rubinstein, E.H. (1987). Cholinergic cerebral vasodilator effect of ketamine in rabbits. *Stroke*, 18(2), 445-9.
91. Hara, K. ve Harris, R.A. (2002). The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthesia and Analgesia*, 94(2), 313-8.

92. Bazin, J.E. (1997). Effects of anesthetic agents on intracranial pressure. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*, 16(4), 445-52.
93. Mayhan, W.G. (2001). Regulation of blood-brain barrier permeability. *Microcirculation*, 8(2), 89-104.
94. Pinard, E., Engrand, N. ve Seylaz, J. (2000). Dynamic cerebral microcirculatory changes in transient forebrain ischemia in rats: involvement of type I nitric oxide synthase. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(12), 1648-58.
95. Hauck, E.F., Apostel, S., Hoffmann, J.F., Heimann, A. ve Kempfski, O. (2004). Capillary flow and diameter changes during reperfusion after global cerebral ischemia studied by intravital video microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(4), 383-91.
96. Boswell, C.A., Majno, G., Joris, I. ve Ostrom, K.A. (1992). Acute endothelial cell contraction in vitro: a comparison with vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Microvascular Research*, 43(2), 178-91.
97. Tilton, R.G., Kilo, C., Williamson, J.R. ve Murch, D.W. (1979). Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvascular Research*, 18(3), 336-52.
98. Hammersen, F. ve Hammersen, E. (1984). Some structural aspects of precapillary vessels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 6 Suppl 2, S289-303.
99. Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., Einhaupl, K. ve Dirnagl, U., *Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study*, in *Circulatory Research*. 1994. p. 55-62.
100. Wu, D.M., Kawamura, H., Sakagami, K., Kobayashi, M. ve Puro, D.G. (2003). Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(6), H2083-90.

101. Kawamura, H., Kobayashi, M., Li, Q., Yamanishi, S., Katsumura, K., Minami, M. ve diğeri. (2004). Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *Journal of Physiology*, 561(Pt 3), 671-83.
102. Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D.M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K. ve diğeri. (2003). ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *Journal of Physiology*, 551(Pt 3), 787-99.
103. Yamanishi, S., Katsumura, K., Kobayashi, T. ve Puro, D.G. (2006). Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 290(3), H925-34.
104. Wood, J.H. ve Kee, D.B., Jr. (1985). Hemorheology of the cerebral circulation in stroke. *Stroke*, 16(5), 765-72.
105. Popel, A.S. ve Johnson, P.C. (2005). Microcirculation and hemorheology. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 37(1), 43-69.
106. Hossmann, K.A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7-8), 1057-83.

EK 1

Bu tezde yer alan farede kranial pencere açılarak yapılan intravital görüntüleme deneylerinin ve izole retinal damarlarda yapılan direkt görüntüleme deneylerinin bulguları Nature Medicine adlı derginin Eylül 2009 sayısında yayınlanmış olan “Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery” isimli makalede yayınlanmıştır.