

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE KLARİTROMİSİN'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet AKTOKLU

Trabzon-2018

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE KLARİTROMİSİN'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet AKTOKLU

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi A. Rıza GÜVERCİN

Trabzon-2018

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bana verdikleri desteklerinden ötürü Prof. Dr. Süleyman BAYKAL, Prof. Dr. Kayhan KUZEYLİ, Prof. Dr. Haydar USUL, Prof. Dr. Ertuğrul ÇAKIR, Doç. Dr. Erhan ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Uğur YAZAR ve Yrd. Doç. Dr. Ali Rıza GÜVERCİN hocalarıma, ve diğer değerli mesai arkadaşlarıma, dua ve emeklerini üzerimden hiç eksik etmeyen eşim Sevda Aktoklu ve kızım Simay Aden'ime, aileme, destek ve sabırlarından dolayı teşekkür ederim.

Dr. Mehmet AKTOKLU



ÖZET

SIÇANLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON YARALANMASINDA KLARİTROMİSİN'İN ETKİLERİ

Amaç: Bu çalışmada geçici beyin iskemisi oluşturulan sıçanlardaki iskemi üzerine klaritromisinin hipokampal bölgede malondialdehid düzeylerine ve nörolojik muayene üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada her biri ortalama 220–280 gr arasında olan 38 adet sprague dawley tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edilmiş su ve yem kısıtlaması olmaksızın standart koşullar altında ve ayrı ayrı kafeslerde izlendiler ve her sıçan yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlenmiştir. Sıçanların 1, 4, 7. ve 10 gün sonunda fizik muayeneleri yapıp bederson skalasına göre puanları hesaplanmıştır. Yine 10.gün sonunda sıçanların kapitasyonu yapıp, beyin dokularında ve plazmada MDA düzeyleri hesaplanmıştır. 12 sıçandan oluşan İskemi+ilaç(klaritromisin) grubuna 30 dk bilateral karotis kliplemesi + hipotansiyon (10ml/kg) yapıldıktan sonra her gün klaritromisin 100 mg/kg/gün intraperitoneal verildi. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 12 sıçandan oluşan iskemi grubuna 30 dk bilateral karotis kliplemesi+hipotansiyon(10ml/kg) oluşturuldu. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 7 sıçandan oluşan sham grubuna 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.gün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 7 sıçandan oluşan pür kontrol grubuna anestezi sonrası cilt laserasyonu yapıldı ve 10 gün boyunca klaritromisin intraperitoneal verildi. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. beyin dokularında ve plazmada MDA düzeyleri hesaplanmıştır

Bulgular: Klaritromisin uygulanan tedavi grubunda nörolojik muayene skoru tedavi edilmeyen iskemi grubuna göre istatistiksel olarak daha anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İskemi uygulanan iki grupta MDA düzeylerinde anlamlı olarak yükselme saptanmıştır. Yine iskemi uygulanıp tedavi grubuna alınan sıçanların doku

ve plazma MDA düzeylerinin iskemi yapıp tedavi uygulamayan gruba arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada, klaritromisin beyin iskemi-reperfüzyon injürisinde nöroprotektif etkisinin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Malondialdehid, klaritromisin



SUMMARY
EFFECTS OF CLARITHROMYCIN ON EXPERIMENTAL BRAIN
ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN RATS

Purpose: In this study, we aimed to search the effect of rifampicin on malondialdehyd in hypocampal region and the neurologic findings at rats with artificially maintained transient brain ischemia.

Materials and Method: Total of 38 Spraque dawley rats weighing 220-280g were included in the study. In order to demonstrate two vessels occlusion+ hypotension ischemia-reperfusion model, bilateral carotid arteries are clamped temporarily (for 30m) and 3 cc blood was extracted from the heart to obtain hypotension. Reperfusion is established with the removal of the clamps. One group consisting of 12 rats received 100mg/kg/day clarithromycin intraperitoneally subsequent to 30 minutes bilateral carotid occlusion+ hypotension (10ml/kg). Post operative first, fourth, seventh and tenth day neurologic examinations are done. At the tenth day the rats are sacrificed and brain tissues are extracted. Another group of seven rats had only skin laceration. First, fourth, seventh and tenth day neurologic examination are done. At the end of the tenth day these rats also sacrificed and their brain tissues are extracted. The last group of seven rats had only 15 minutes anesthesia. First, fourth, seventh and tenth day neurologic examination are done. At the end of the tenth day these rats also sacrificed and their brain tissues are extracted.

Findings: the neurological examination score in the treatment group treated with clarithromycin was found to be statistically higher than that of the untreated group of ischemia. There was a significant increase in MDA levels in the two groups receiving ischemia. Again, there was a statistically significant difference between the tissue and plasma MDA levels of rats treated with ischemia and those treated with ischemia.

Results: In this study, it is showed that clarithromycin has a neuroprotective effect on ischemia-reperfusion injury.

Key words: Ischemia, Malondialdehyd, clarithromycin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	6
2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi	8
2.3 Beyin Doku Histolojisi.....	10
2.3.a. Nöronlar.....	10
2.3.b. Asositler	10
2.3.c. Oligodendrositler.....	11
2.3.d. Ependim hücreleri	11
2.3.e. Mikroglia	11
2.4. Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik Ve Histolojik Özellikleri	11
2.5. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi	13
2.5.1 Oksidatif Stres.....	13
2.5.2. Mitokondriyal Mekanizmalar.....	13
2.5.3. Lökosit İnfiltrasyonu.....	14
2.5.4. Plakette Aktivasyonu	14
2.5.5.Kompleman Aktivasyonu	15
2.5.6. Kan Beyin Bariyer Disfonksiyonu	15
2.6. Myeloperoksidaz (Mpo).....	15
2.7. Lipit Peroksidasyonu Ve Malonaldehit (Mda).....	16
2.8. Klaritromisin	16
3. MATERYAL VE METOD.....	17

3.1. Deney Hayvanları.....	17
3.2. Gruplar	17
3.3. Metod	18
3.4. Malondialdehit Tayini.....	23
3.4.1. Dokuda Malondialdehit Tayini:	23
3.4.2. Doku Mda Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
3.4.3. Plazmada Malondialdehit Tayini:	25
3.4.4. Serum Mda Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.5. Serum Mda Ölçümü:	26
3.6. Motor Muayene.....	27
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
7. KAYNAKLAR	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: İskemik beyin hasarında oluşan zonlar	4
Şekil 2: İskemi esnasında patofizyolojilerin zamansal dağılımı.....	5
Şekil 3: Willis poligonu ve serebral arterler	9
Şekil 4: Ratların beyin anatomisi.....	12
Şekil 5: Ratların vasküler anatomisi	12
Şekil 6: Klaritromisin kimyasal yapısı	16
Şekil 7: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	25
Şekil 8: Serum MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	27



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: Bederson skalası	7
Tablo 2: Deneysel beyin iskemi reperfüzyon yaralanmasında takip parametreleri	7
Tablo 3: Bederson nörolojik muayene skalasına göre puanlama	27
Tablo 4: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson skorlarının median ve min-max değerleri	30



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 1: Supine pozisyonunda paratrakeal alanların disseksiyonu	18
Resim 2: Sol A.Carotis Communise Yaşargil klibi yerleştirilmesi.....	19
Resim 3: Bilateral A.Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klibi yerleştirilmesi	19
Resim 4: Sütüre edilmesi.....	20
Resim 5: Sıçanların ayrı ayrı yerleştirilmesi	20
Resim 6: Sıçanlar besin ve suya ulaşabileceği ayrı ayrı yaşam alanları.....	21
Resim 7: Sakrifiye edilen ratların beyin dokusunun çıkarılması.....	21

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 1: Doku MDA ortalamaları	29
Grafik 2: Serum MDA ortalamaları.....	29



1. GİRİŞ

İnme Dünya sağlık örgütünün yapmış olduğu tanıma göre ; “hızlı şekilde ortaya çıkan ve 24 saat veya daha fazla süren ya da ölümle sonuçlanabilen, beyin işlevlerin fokal ya da global bozukluğuna bağlı bulgular” olarak tanımlamaktadır (1,2,3). Stroke dünya çapında mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerindendir (4,5). 2017 verilerine göre ABD yaklaşık olarak 795000 stroke vakası görülmektedir(6). Yine bu istatistik ışığında her 40 saniyede bir kişi stroke geçirmekte ve 4 dakikada bir kişi stroke sonucu hayatını kaybetmektedir(7,8). Türkiye ‘de 2001 yılında yapılan bir çalışmada, tüm hastalıklar içerisinde 2. en sık morlalite sebebi olduğu ortaya koyulmuştur(9). Stroke olgularına bakıldığında %80-85’i iskemiye bağlı, %15-20’si hemorajik nedenlere bağlıdır(10). Mortalite ile sonuçlanmayan vakaların bir çoğunda günlük hayatını tek başına idame ettiremeyen, morbiditesi yüksek bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.

Mortalite ve morbiditesi bu denli önemli bir sağlık sorunu olması sebebiyle hastalığın patolojisi, tanı ve tedavi seçeneklerine yönelik birçok çalışma ve deneysel modeller kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar ile birçok önleyici ve tedavi edici yöntem halihazırda klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak önümüzde aşılması gereken bir çok problem bulunmaktadır.

İskemi esnasında core bölgesi olarak adlandırılan merkez bölgede kan akımı kritik noktanın altına düşer ve doku hücrelerde hızla nekroz gelişmeye başlar. Bu core bölgesinin etrafında kollateral dolaşım sayesinde değişik düzeyde beslenmesi olan ve kalıcı hasarın halen oluşmadığı bölge mevcuttur. Penumbra olarak adlandırılan bu bölgede ki beslenmenin düzelmesi sağlanmassa bu bölgede de saatler içinde nekroz gelişmeye başlar. Stroke tedavisinde hedef bu alanın perfüzyonunun yeniden sağlanmasıdır. İskemi esnasında reperfüzyon olarak adlandırılan, beyin kan akımını yeniden sağlanmasını akut stroke tedavisinin ana hedefidir. Stroke hastalarının yaklaşık %50-70 spontan olarak reperfüzyon gelişmektedir(11). Bununla birlikte trombolitik tedaviler, endovasküler yöntemler gibi yöntemler akut tedavide kullanılmaktadır(12). İskemi esnasında doku kan akımının yeniden sağlanması ile birlikte iskeminin kısa ve uzun vadede oluşturduğu hasarı azaltmak , beyin

fonksiyonlarını normale yakın tutmak için de bir çok medikal tedavi ve uygulama da kliniklerde kullanılmaktadır. Bu etkiler arasında reperfüzyon yaralanmasıda önemli bir yere sahiptir. Her ne kadar dokunun yeniden kanlanması akut iskemi tedavisinin hedefi olsa da , reperfüzyona bağlı hasar beyin fonksiyonlarda iskeminin yapmış olduğu hasardan daha kötü bozulmalara yol açabilmektedir(13). Bu sebeple iskemi sonrası reperfüzyon hasarına yönelikte çok sayıda çalışma ve modelleme yapılmakta ve beyni koruyucu yöntem ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasından birkaç örnek vermek gerekirse hipotermi , steroidler ,kalsiyum kanal blokörleri , serbest radikalleri azaltmaya yönelik tedaviler ,antienfalmatuarlar ve çeşitli vitaminler söz konusu olabilir(14).

Son yıllarda iskemin ve sonrasında gelişen reperfüzyon yaralanmasının patofizyolojisi araştırmak amacıyla, sıçanlarda bilateral karotis kommunis kliplenmesi ve hipotansiyon oluşturulması yaygın olarak kullanılmaktadır(15). Çalışmamızda da güncel olarak kullanılan ve uygulanması kolay bir yöntem olması sebebiyle bu model tercih edilmiştir.

Makrolid grubu antibiyotikler günümüzde yaygın olarak kullanılan antibiyotik türlerindendir. Eritromisin, klaritromisin, azitromisin ,sipiramisin bu antibiyotik ailesinin başlıca gelen üyelerindendir. Makrolidler 50S bakteriyel ribozoma etki ederek, peptidil transferazı inhibe edip, protein sentezini bozarak mikroorganizmalara etki ederler(16). Klaritromisin(CAM, 6-0 methylerythromycin) in vivo vr in vitro yapılan çalışmalarda hipoksiye toleransı artığını destekleyen bulgular bulunmaktadır(17,18,19,20). Ayrıca inflamatuvar süreçlerin azaltılmasında da etkisi olduğu, hayvan ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir(21,22,23,24).

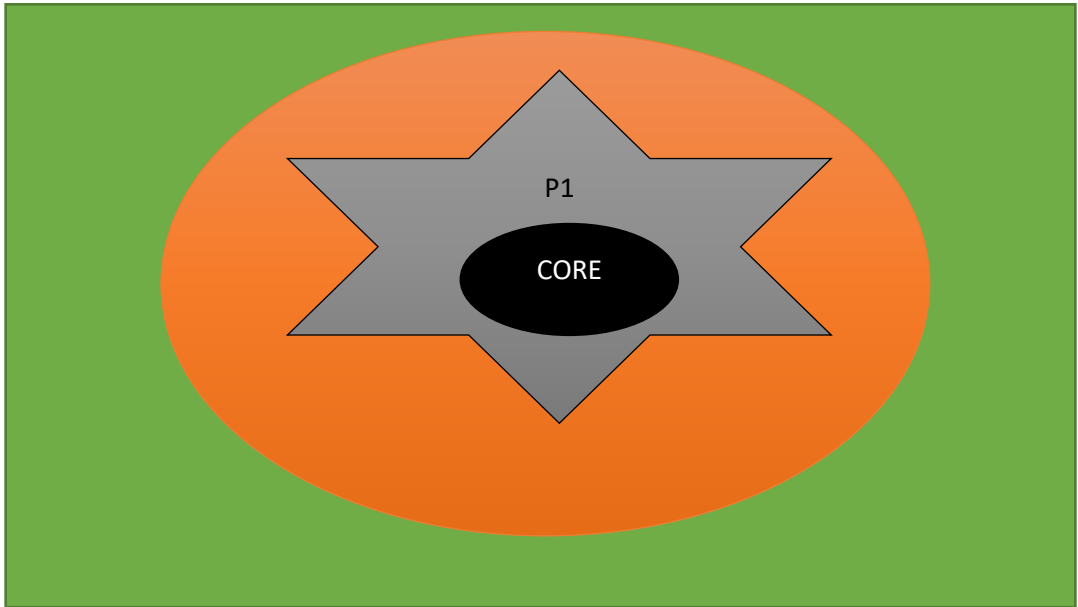
Tüm bu bilgiler ışığında biz bu çalışmamızda klaritromisinin fokal beyin iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerinde ki nöroprotektif etkisini araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

İskemik beyin hastalıkları ölüm yada sakatlıkla sonuçlanabilen önemli bir patolojidir. İnme serebrovasküler hastalıklara bağlı olarak gelişen beyin kan akımında azalma yada tamamen kesilmesi sonucu ani gelişen serebral işlevlerin fokal ya da global olarak etkilenmesi olarak tanımlanabilir(25). Dünya sağlık örgütü ise inmeyi ‘‘ani başlayan ani başlayan 24 saat ve üzerinde devam eden ölümle sonuçlanabilen serebral işlevlerin fokal ya da global olarak bozulduğu durum ‘’ olarak tanımlamaktadır(2,3). Santral sinir sistemide ortaya çıkan iskemi global ya da fokal olarak birbirinden farklı lezyonlar oluşturmakla birlikte temelde benzer patofizyolojisi olan iki ayrı gruptur(26). Global iskemi kan akımı tamamen kesilmiştir ancak fokal iskemi kollateral dolaşımlar sayesinde az miktarda kan akımı devam etmektedir ki bu durum nöronlarda geri dönüşümü olabilecek düzeyde metabolik aktiviteye müsaade ederek membran devamlılığının sağlanmasına yardımcı olabilir(27,28). İskemi süresince dokularda yapısal ve metabolik değişiklikler görülmeye başlanır(29). Dokuya ulaşan kan akımının azalması ile dokuda oluşan hücrede oksidatif fosforilasyon azalmaya ve bu durumun yansıması olarak adenozin-5 trifosfat(ATP) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili moleküllerin sentezi azalır(30). Hücrede enerji depoları bu durum karşısında hızla boşalmaya başlar. Bu enerji açığının sonucu olarak hücre zarında bulunan Na^+, K^+ -ATP az pompası çalışamaz hale gelir. Pompanın iş göremez hale gelmesi ile hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları hızla artmaya başlar(31). Hücre içindeki bu Ca^{+2} iyon konsantrasyonunda ki önlenemez artış artık hücre için sitotoksik bir durum oluşturur(32). Üstelik bu dönemde meydana gelen iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflatuar sitokinlerin lökosit adhezyon bileşenlerinin yapımı ve göç etmelerinde artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin yapımında düşme oluşur ki bu durum sonunda hücreyi, reperfüzyon sırasındaki uygunsuz şartlara korumasız hale getirir(29). Özetle bahsetmek gerekirse inmeyi takipeden süreçte gelişen beyin hasarı iyonik dengesizlik, peri-enfarktüs depolarizasyon, asidotoksisite, oksidatif ve nitratif stres , eksitotoksisite ,infalamasyon ve apoptozisi içeren birden fazla mekanizma ve yolların değişik seviyelerde rol alması sonucunda gelişir(33,34). Tüm bu durumların yanında nöronların bölgesel olarak da iskemi duyarlılıkları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örnek vermek gerekirse gri cevher , korpus striatum ,

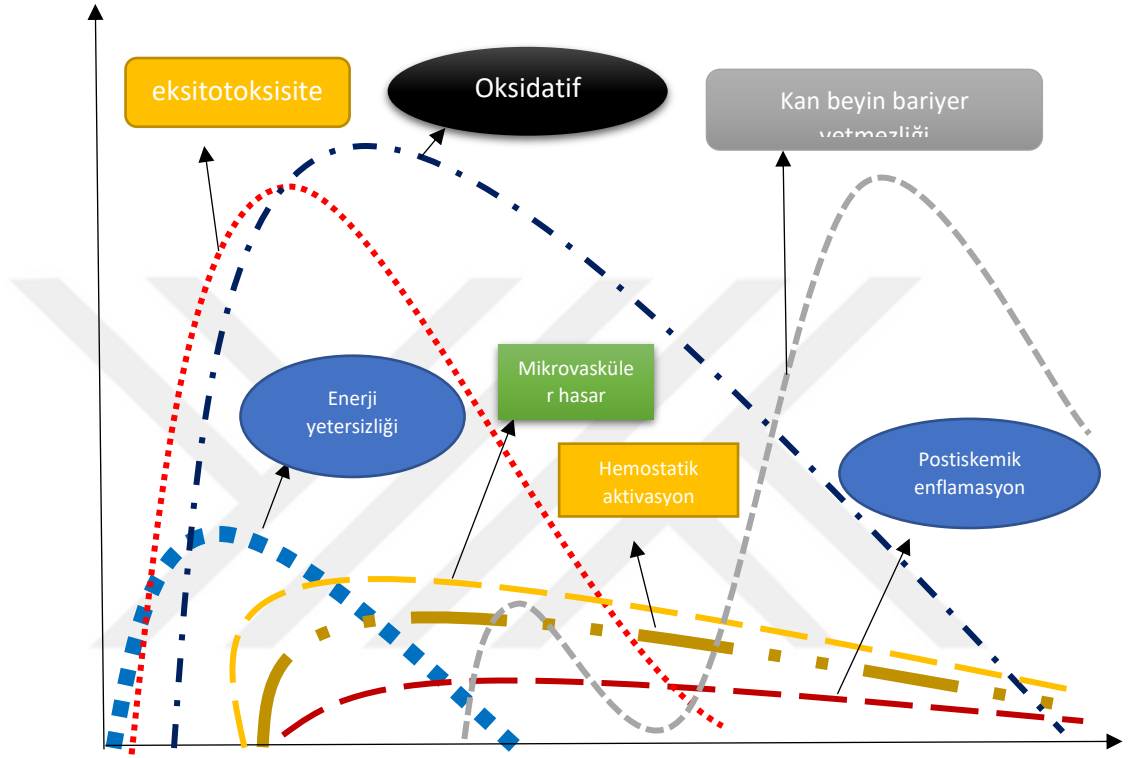
hipokampus CA1 serebellar purkinje hücrelerinin iskemiye daha duyalı olduğu bilinmektedir(35).

Beyin metabolik aktivilerin devamı hassas bir şekilde oksijen ve glukozla bağıdır. Bu durumun sürekliliğinin sağlanabilmesi için serberal kan akımı yaklaşık 55ml/100gr/dk olacak şekilde dikkatli bir şekilde regüle edilir.bu hassas denge sayesinde nöronlarda hücre membran potansiyeli, nörotransmitter salınımı ve paketlenmesi, hücre yapısının desteklenmesi sağlanmış olur (36,37,38). Eğer serebral kan akımı, yaklaşık olarak 20 ml/100gr/dk eşiğinin altına inersekoksijenin serebral metabolik hızı düşer ve iskemi ile sonuçlanan sürecin başlamasının sağlar (39). Bu perfüzyon azalması ve kaybı etkilenen bölgede zonlar halinde bazı alanların oluşmasına sebep olur. Şöyle ki iskemik İskemik yaralanmadan zarar gören; C: iskemik core bölgesi (10-12 ml/100gr/dk'dan az perfüzyonu olan bölge), P1: iskemik core alanına komşu bölge (18 ml/100gr/dk'dan az perfüze olan bölge) bu bölgenin perfüzyonu düzelmezse birkaç saat içinde nöron kaybı oluşmaya başlar, P2: Tehlikeli penumbra bölgesi (hipoperfüzedir ancak genellikle nöronlar minimal şekilde metabolik devamlılığını devam ettirir), N: Normal parenkim (penumbra'ya uzak olan bölge)(şekil 1).



Şekil 1: İskemik Beyin Hasarında Oluşan Zonlar

İskemi esnasında yukarıda kısaca bahsedilen süreçler birbirlerinden farklı zamanlarda, birkaç dakika ile saatler hatta günler gibi bir süreç yelpazesinde ortaya çıkabilmektedirler. Core bölgesinde dakikalar içerisinde nöron kaybı oluşmaya başlarken kollateral akımlarının verimine göre diğer bölgelerde bu süreç biraz daha uzun zamana yayılabilmektedir(40,34)(şekil 2).



Şekil 2: İskemi esnasında patofizyolojilerin zamansal dağılımı

İskemi esnasında hızla başlayan ve birbirini takip eden yolaklardaki eksitotoksisitenin erken yayılımında; aşırı Ca^{+2} ve diğer iyonların hücre içine girmesi, hücre şişmesi, hücre içi kinazların ve proteazların aktive olması, reaktif oksidatif ve nitrosatif ürünlerin (ROS, RNS) yüksek miktarlara ulaşması, hücre membranlarının hasarlanması ve organel yetmezlikleri görülür(33). Bu durumda yavaş yavaş gelişen enflamatuvar yanıtı da kolaylaştırır(33). Sitoplazma da artan Ca^{+2} ; mitokondriyal elektron transport zincirini inhibe olmasına ve süperoksit anyonunun salınımını ve peroksinitrit üretimini destekleyen nitrik oksit sentezinin de artması imkan sağlar (33,41). Glutamat' ın artışı, astrosit fonksiyonları bozulmasına ve bunun sonucunda astrositler tarafından glutamat alımı bozulmasına sebep olur (42,43,44).

İskemik hasarın patofizyolojisinde yer alan başlıca faktörleri özetlemek gerekirse , enerji yoksunluğu, iyon gradiyentinin bozulması, laktik asidoz, toksik radikaller , lipid metabolizmasındaki değişimler, araşidonik asit yıkım zincirinin aktivasyonu, eksitatör nörotransmitterlerin artması ve buna bağlı kalsiyum homeostazisinin bozulması, hücre içi ve dışı proteolitik enzimlerin aktive olması, nitrik oksit ve sitokinlerin salınımı olarak özet yapılabilir. (45).

2.1. Tarihçe

Serebro vasküler hastalıklar hipokrat döneminden beri bilinen insanlık tarihi kadar eski bir patolojidir. Bu hastalıkların önlenmesi, teşhis ve tedavi yöntemleri de yıllardır irdelenen önemli bir alandır. Klinik pratikte iskeminin etkisi fonksiyonel ve geçici olabildiği gibi derecesine bağlı olarak yapısal ve kalıcı sonuçlar da doğurabilir(46).

Deneyisel araştırmalar birçok hayvan türü üzerinde yapılmıştır. Son yıllarda tavşanlar, gerbiller ve sıçanlar başlıca deney hayvanı olarak kullanılan türlerdir(46). Kolay bulunulduğu, ucuz olması çeşitli nörotransmitter sistemlerinin, nörokimyasının ve nörofarmakolojisinin diğer hayvanlar göre daha ayrıntılı bilinmesi ve en önemlisi serebral dolaşım anatomisinin insana büyük benzerlikler göstermesi gibi birçok nedenden ötürü özellikle sıçanlar en çok kullanılan hayvan türü olma özelliğine sahiptirler(46).

1960 yılında Levine S. sıçanlarda deneyisel beyin iskemisi yamış ve yayınlamıştır (47). 1982 yılında Pulsinelli ve arkadaşları damar oklüzyonu sonrası global iskemi modelini yapmıştır(48). Deneyisel serebral iskemi oluşturulması için iki damar oklüzyon ve dört damar oklüzyon modellerinin ortaya konulması 1960'lı yıllara dayanmaktadır(46).

Global İskemi Modelleri:

1- Sıçanlarda dört damar oklüzyon modeli: İki taraflı vertebral arterler kalıcı olarak koterize edilip, bilateral ana karotis arterler 10–30 dakika süreyle klemplenerek kapatılır (49).

2- Sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modeli: İki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon sağlanır ve eş zamanlı olarak, denekten kan alınarak 50 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır (50).

3- Gerbillerde iki damar oklüzyon modeli: Bu modelde vertebral arterler gelişmediğinden, her iki karotisin geçici oklüzyonu, Will's poligonunda dolaşımı bozan beyin iskemisi sağlanır (51).

Global ve fokal iskemi sonrası nörolojik değerlendirme yapılabilse için Bederson ve ark. Nörolojik muayene için skala geliştirmiştir. (52), (Tablo 1).

Nörolojik muayene

Tablo 1: Bederson skalası

Grade 0	Nörolojik defisit yok	5 puan
Grade 1	Ön bacaklarda flexiyon	4 puan
Grade 2	Dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç	3 puan
Grade 3	Grade 2'ye ilave olarak dönme hareketinin eklenmesi.	2 puan
Grade 4	Exitus	1 puan

Sıçanların deneysel beyin iskemi-reperfüzyon yaralanması deneylerinin takip için parametreler genel olarak aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2).

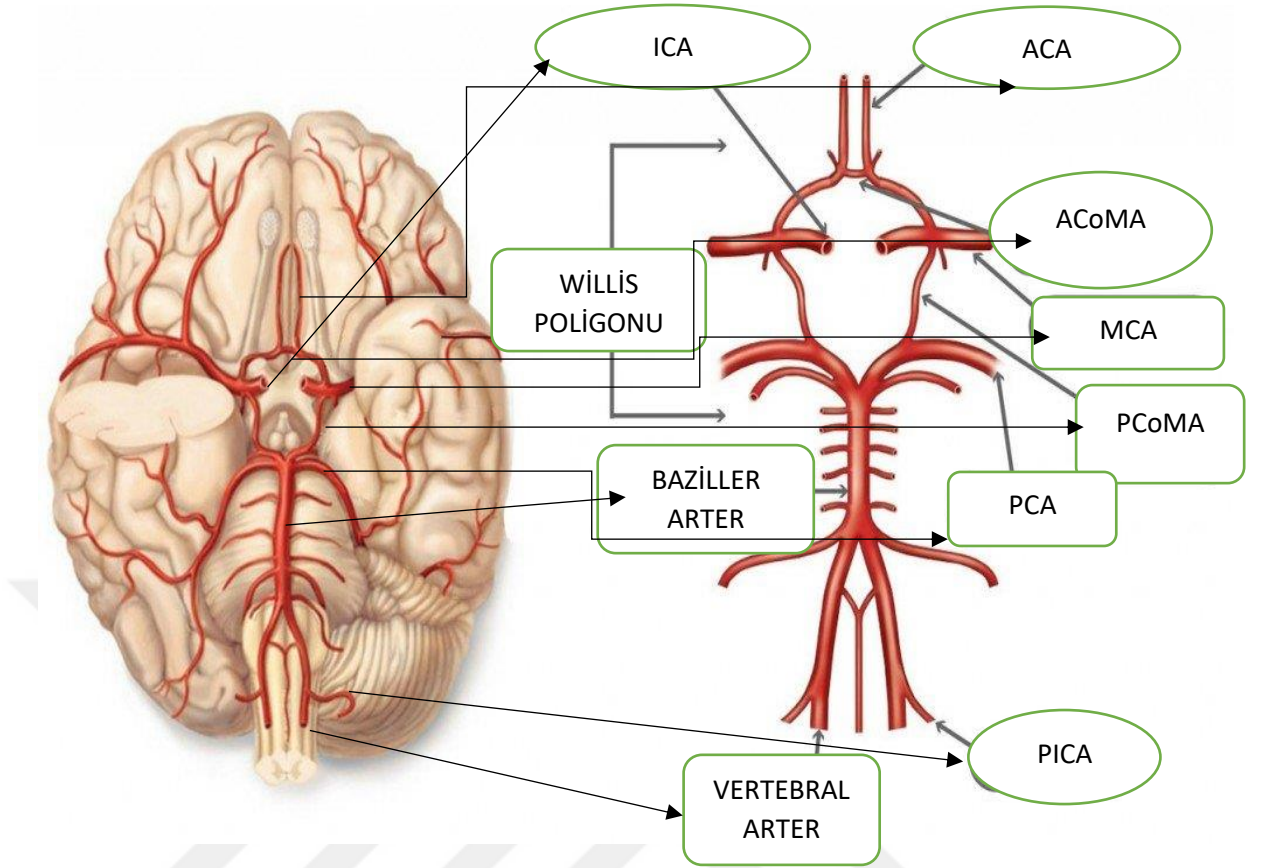
Tablo 2: Deneysel beyin iskemi reperfüzyon yaralanmasında takip parametreleri

Klinik ve nörolojik muayene	Bederson motor skalası
Histolojik muayene	Nöron sayımı, infarkt volümü ölçümü
Angiografik değerlendirme	
Aksonal tarayıcılar ile değerlendirme	
Biyokimyasal ölçümlerle değerlendirme	Malondialdehit, Myeloperoksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vs
Nörofizyolojik değerlendirme	Uyarılmış potansiyeller, EEG

2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi

Serebral dolaşım ile ilgili ilk tanımlama 1664 yılında Willis tarafından yapılmıştır(53). İnfüzyon tekniğine kullanarak kendi ile bilinen damar da dahil olmak üzere bir çok küçük serebral arteri ayrıntılı şekilde 1872 yılında Heubner tarafından tanımlanmıştır. Windle, 1884-1888 yılları arasında kadavralarda anomali ve varyasyonları , Sicard ve Forestier, 1922 yılında Lipiodol kullanarak hayvanların serebral arter ve dolaşımlarını tanımlamayı başarmıştır. Egas Moniz, 1927 yılında Strontium bromide ve Lityum bromide kullanmış ve serebral damarların radyografik olarak görüntülenmesini başarmıştır. 1936'da Loman ve Myerson, ilk kez anjiyografi yapmayı başarmıştır. 1 Seldinger, 1951 yılında anjiyografinin bütün tipleri tanımlanmıştır. Ecker ve Reiemenschneider, 1951 yılında anjiyografik vazospazmı tanımlamayı başarmışlardır. 1960 yıllardan sonra serebral anjiyografilerde ki gelişmeler artarak devam etmiş ve birçok vasküler patolojinin tanı takip ve tedavisinde önemli yere sahip vazgeçilmez bir uygulama olamayı başarmıştır(53,54,55,56).

Beynin iskemi modellerinin yapılması ve değerlendirilmesi açısından beyin vasküler yapılarının iyi şekilde anlaşılması önem arz etmektedir. Temel olarak beyin kan dolaşımını iki ana damar yapısı sağlar. Bunlar bilateral olacak şekilde oluşmuş internal karotid arterler ve vertebral arterlerdir. Her iki arter sisteminin belli seviyelerde dalları ayrıldıktan sonra Willis poligonu denilen damarsal bağlantı ağını oluşturarak beynin vasküler anlamda yeterli kanlanması için garanti altına almak için bir araya gelirler. Bu karışık damarsal yapıdan kısaca bahsedilecektir.(şekil 3)



Şekil 3: Willis poligonu ve serebral arterler

İNTERNAL KAROTİD ARTER(ICA): Ana karotis raterden ayrılarak, ekstrakranial herhangi bir dal vermeden petroz kemikten kraniuma girer. Çok sayıda yapılmış sınıflama mevcuttur ancak kabaca anatomik olarak servikal, petröz, kavernöz, klinoidal ve sisternal olmak üzere 5 segmentte ayrılır(57).

ANTERİÖR SEREBRAL ARTER(ACA): İnternal karotid arterin terminal dallarında biridir. 5 segmentte incelenir. ACA A1 segmentleri kommunikan arter vasıtasıyla bir ön sistemde kollateral dolaşımı oluştururlar(53).

ANTERİÖR KOMUNİKAN ARTERE(ACoMA): Lamina terminalis sisterni için bulunan her iki A1 segmentin birbiri ile birleşmesini sağlayan 2-3 mm uzunlukta ve 1-3 mm çapında olan arterdir(58,59). Varyasyonu çok sayıda olan bir arterdir(53).

ORTA SEREBRAL ARTER (MCA): İnternal karotid arterin terminal dallarındandır ve M1(sfenoidal) , M2(insular) , M3(operkular) , M4(kortikal) olmak üzere 4 segmenti bulunur(53).

VERTEBRAL ARTER(VA): Subclavian arterlerden çıktıktan sonra 4 segmentte incelenen foramen magnumdan girdikten sonra posterior sistemin iki ana arterinden biridir. Önemli dalları arasında anterior spinal arter ve posterior inferior serebella arter(PICA) bulunmaktadır(53).

BAZİLLER ARTER(BA): Yaklaşık 3-8 mm çapında ve 2-4 cm uzunluğunda ponsun yüzeyinde prepontin sistern içinde seyreden arterdir. Anterior inferior serebellar arter (AICA) , posterior spinal arter gibi önemli dalları bulunur(53).

POSTERİÖR SEREBRAL ARTER (PSA): Baziller bifurkasyon çıktıktan sonra interpediküler sistern içerisinde posterior komunikan arter ile birleşerek Willis poligonun tamamlanmasını sağlar. 4 segmenti bulunmaktadır.(53).

2.3 BEYİN DOKU HİSTOLOJİSİ

santral sinir sisteminin hücreleri embriyolojik olarak iki yapıdan köken alırlar.(60).

A) Nöroektoderm Kökenliler: Nöronlar , astrositler , oligodendrositler , ependim hücreleri.(60).

B) Mezenşimal Kökenliler: Meningeal kan damarları, adipoz doku, mikroglialar.(60).

2.3.a. Nöronlar

Sinir sisteminin en temel ve asıl fonksiyonunu gerçekleştiren hücreleridir. Nöronlar yapılarına, şekillerine, salgıladıkları nörotransmitter gibi birçok özelliklerine göre sınıflandırılabilirler(60). Dendrit ve aksonları denilen yapıları sayesinde diğer birçok hücre tipinde farklılık gösterirler.

2.3.b. Asrositler

Santral sinir sisteminde kan beyin bariyerini oluşturmak , nöronların iyonik ve kimyasal ortamını düzenlemek , GABA ve glutamat salınım ve dönüşümü gibi işlemlerde rol alan destek hücreleridir(60).

2.3.c. Oligodendrositler

Oligodendrositlerin santral sinir sisteminde görevi myelinizasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu görev periferik sinir sisteminde scwann hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir(60).

2.3.d. Ependim hücreleri

Santral sinir sisteminde boşluklarının yüzeyinin döşeyen hücrelerdir(46).

2.3.e. Mikroglia

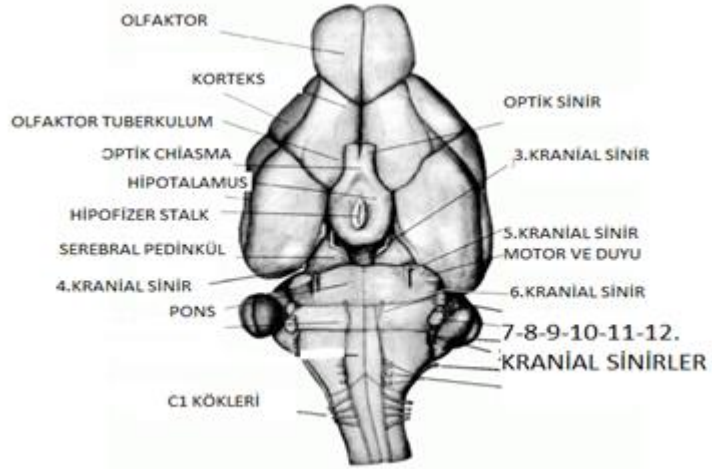
Retiküloendotelyal sisteminin santral sinir sisteminde ki komponentleridir(60). Nötral proteazlar ve oksidatif radikaller üreterek, inflamasyon gelişmesinde ve bunun geriye dönüşünde görev alan hücre grubudur(61,62).

2.4. Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik Ve Histolojik Özellikleri

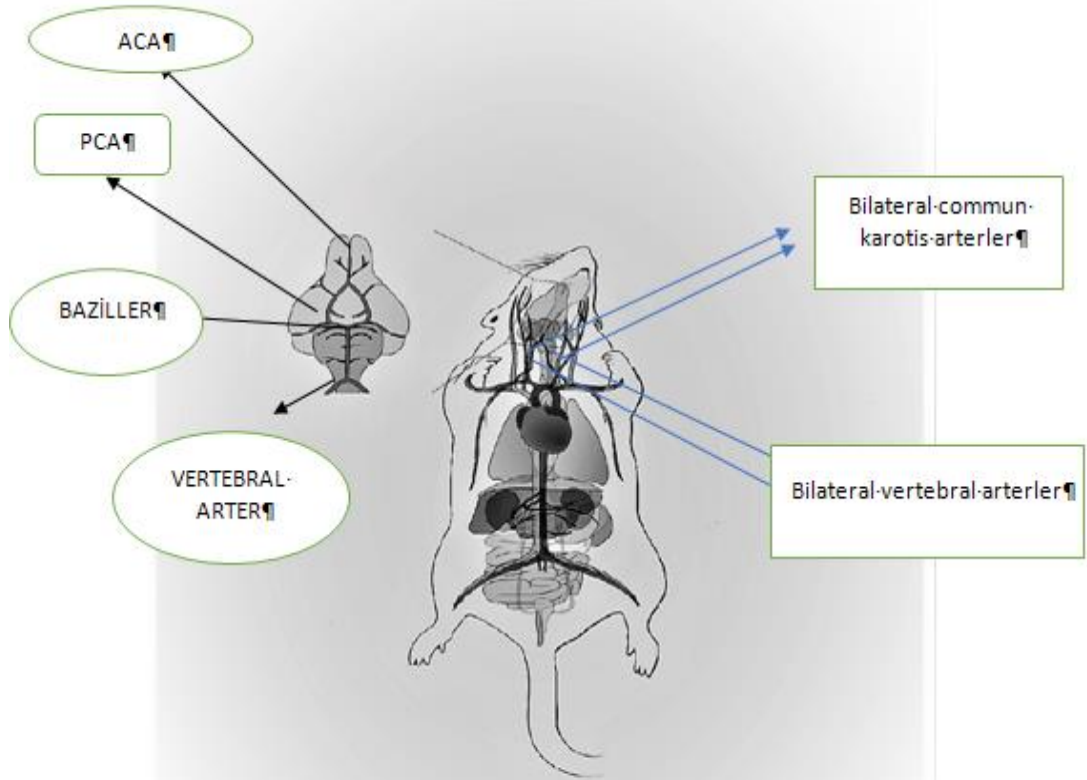
Hipokampus gelişimi esnasında başlarda dorsalde yer alırken gelişimin devamında temporal lobun ventral ve medialine yerleşmeye başlar. Hipokampus temporal bölge korteksinin bazı parçalarının ventriküllerin ventral yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru yer değiştirmesi ile şekillenir (63)(şekil 4).

Granüler ve piramidal hücrelerin dentritleri moleküler tabakaya doğru uzanırlar. Bunun devamında ayrıca piramidal hücre tabakasında daha büyük piramidal hücreler görülür. Bunların dentritleri hem moleküler tabakaya hem iç tabakaya uzantılar verir. İçte ise polimorfik tabaka yer alır. Bu tabakada piramidal ve granüler hücrelerle bazı glial elemanlar bulunur. Hipokampusun en iç tabakasında yani lateral ventrikülle olan komşuluğunda, subikulum ve hipokampusdaki hücre gövdelerinden çıkan myelinli aksonlardan oluşan bir tabaka bulunur. Bu tabakaya alveus denir. Cornu ammonis'in baş harflerinden CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapılanmasına göre incelendiğinde CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt grupta incelenir. CA1, subikulum ile hipokampus arasında ,

CA2 ve CA3 hipokampusda , CA4 ise hipokampusun girus dentatus ile birleşim yeridir (64,65).



Şekil 4: Ratların beyin anatomisi



Şekil 5: Ratların vasküler anatomisi

2.5. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi

İskemi beyin dokusu giden kan akımı yetersizliği sonrası, dokunun ihtiyacı olan oksijen ve metabolitlere karşıyamaması sonrası meydana gelen patolojik bir durumdur. Nöronlar depo kabiliyetleri olmadığı için iskemiye aşırı duyarlıdır. İskemi sonrası beyinde perfüzyonun yeniden sağlanması ile de nöral dokuda reperfüzyon hasarı denilen yeni bir problem ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon hasarında oksidatif stres , lökosit infiltrasyonu , mitokondriyal mekanizmalar , platelet aktivasyonu , kompleman aktivasyonu , kan beyin bariyeri bozulması gibi bir takım patolojiler rol oynar ve bunlar beyin ödemi ve hemorajik transformasyonlara zemin hazırlayarak nöron ölümüne ve disfonksiyonuna neden olurlar(66).

2.5.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres süperoksid anyonları , serbest oksijen radikalleri , peroksidler gibi reaktif oksijen ürünlerinin antioksidan kapasitenin üstüne çıkması ile ortaya çıkar. Oksidatif stres iskemi reperfüzyon hasarında ,beyin ödemi ve hemorajik transformasyon gibi patolojilerin ortaya çıkmasında önemli bir parametredir. Yükselmiş reaktif oksijen radikalleri protein içeren hücresel elemanlara , DNA ,RNA ve lipidlerde hasara neden olur(4).

İskemi reperfüzyon hasarı sırasında reaktif oksijen radikallerinin bir diğer önemli hedefi mitokondridir. Mitokondride oksidatif fosforilasyon proteinlerinin post translasyonel modifikasyonunu indükler ki bu durum mitokondri membran potansiyelini artırır. Bu durum reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu artırır(67). Bir diğer önemli etki elektron transport zincirinin anahtar parçası olan ve plazma membranında bulunan NADPH oksidaz üzerinedir.(68) bu noktayı etki ederek kan beyin bariyeri disfonksiyonuna infarkt miktarının artmasına neden olur(69).

2.5.2. Mitokondriyal Mekanizmalar

Mitokondri bir çok fonksiyonu olan bir organdır ve fizyolojik ve patofizyolojik olaylar üzerinde çok sayıda rolü bulunmaktadır. İskemi reperfüzyon

yaralanmasında yalnızca reaktif oksijen radikali jeneratörü olarak çalışmaz. Apoptozis ve nekroz gibi patolojik süreçlerde rolü vardır(70,71). Gösterilmiştir ki uzun süre iskemi sonrası oluşan reperfüzyon sonrası mitokondri iç membranında bulunan non spesifik bir por olan mPTP açılır. Bu por Ca^{+2} mitokondri içine dolmasını artırır. Sonuçta mitokondri şişer , çözülür ve ATP azalmasına bağlı olarak nekroz ile sonuçlanır(71). Bu pompayı inhibe eden cyclosporin A ve sanglifehrin A gibi maddeler iskemi reperfüzyon hasarını önlemede beyin koruyucu potansiyel moleküller olabilirler(71,72).

Mitokondrinin tubuler morfolojisi sayesinde ortaya koyduğu bir diğer önemli özellikte füzyon reaksiyonlarıdır(73,74). Mitokondri bozulmasına bağlı olarak bu reaksiyonların devam etmemesi hücrelerde apoptozis neticelenir(75,76).

2.5.3. Lökosit İnfiltrasyonu

Serebra iskemi reperfüzyon yaralanmasında enflamasyon önemli bir yer tutar. Enflamasyon sırasında olan lökosit infiltrasyonu ise bu prosesin anahtar noktasını oluşturur. Reperfüzyon sırasında kan beyin bariyerinin bozulması sonucu matriks metaloproteinler , lökosit aktive edici faktörler gibi endotelden salınan sinyaller lökosit aktivasyonunu ve göçünü başlatırlar. Sonuçta lökositler ektravaze olup beyin dokusuna göçe başlarlar ve salgılamış oldukları sitokinler ile enflamasyon ve penumbranın kötüye gidişine neden olurlar(77,78).

2.5.4. Plakette Aktivasyonu

Deneyisel çalışmalar iskemi reperfüzyon yaralanması patolgenezinde plaketteğin yeri olduğu göstermektedir. İskemi ve reperfüzyon esnasında plaketteğler reperfüzyonun erken safhalarında damar yatağında aktive olup toplanmaya başlamaktadır(79). Aşırı artışları ile plaketteğler oksijen radikalleri ve PDGF , araşidonik asit metabolitleri , tromboksan A2 , serotonin , PF4 gibi gibi proenflamatuar faktörleri serbestleştirir. Ayrıca plaketteğ aktivasyonu lökosit infiltrasyonunu da tetikler(80).

2.5.5. Kompleman Aktivasyonu

Kompleman kaskadı enflamasyonu regüle ve kontrol eden , birden çok kaskada sahip patojenik durumlarda aktive olan bir sistem olma özelliği taşır(81). Gösterilmiş ki kompleman sistemi santral sinir sistemi enflamasyonunda nöron kaybında direkt etkisi olan bir durumdur(82,83). Reperfüzyon esnasında kompleman kaskadı değişik yollar üzerinden aktive olabilir. Antijen bağımlı direkt yoldan , alternatif yoldan , MBL/MASP lectin bağımlı yol örnek olarak verilebilir(84,85).

2.5.6. Kan Beyin Bariyer Disfonksiyonu

Kan beyin bariyeri dolaşım ile nöron arasında çok seçici geçirgen özelliği ile kısıtlı geçiş izin veren bir yapıdır. Endotel , perisit ve astrositler ana yapı taşlarıdır. Kan beyin bariyerinin bozulması iskemi reperfüzyon yaralanmasında ana patofizyolojilerdendir ve sonucunda oksidatif stres , lökosit infiltrasyonu , platellet aktivasyonu , kompleman aktivasyonu gibi önceden saydığımız bir çok durumun da başlamasında etken olarak karşımıza çıkar(4). İskemi reperfüzyon yaralanmasında geçirgenlik değişiklikleri 3 evrede ele alınabilir. Evre 1 serebral otoregülasyonun bozulduğu ve geçirgenliğin arttığı reaktif hiperemidir. Mikrovaskular tıkanıklıklara bağlı hipoperfüzyon ve endotelial hücreler ile astrositlerin şişmeye başladığı evre 2 olarak adlandırılır. Bu durum beslenme yetersizliği ve sonrasında nötrofil infiltrasyonları ve enflamasyonla sonuçlanacaktır. Evre 3 ise parasellüler permeabilite artışı enflamasyon, oksidatif stres, endotelial hücrelerin tamamiyle bozulmaya başladığı evredir(86).

2.6. Myeloperoksidaz (Mpo)

Myeloperoksidaz (MPO), polimorf nükleuslu lökositler ve monositlerin azurofilik granüllerine lokalize olmuş lizozomal bir hemoproteindir. Serbest radikaller glutatyon, vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavinoidler gibi normal savunma sistemindeki antioksidanlarca ve glutatyon peroksidaz, myeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimatik korunma mekanizmaları ile yok edilirler.(46). Myeloperoksidaz bununla birlikte genotoksik hipokloroz asit ve diğer

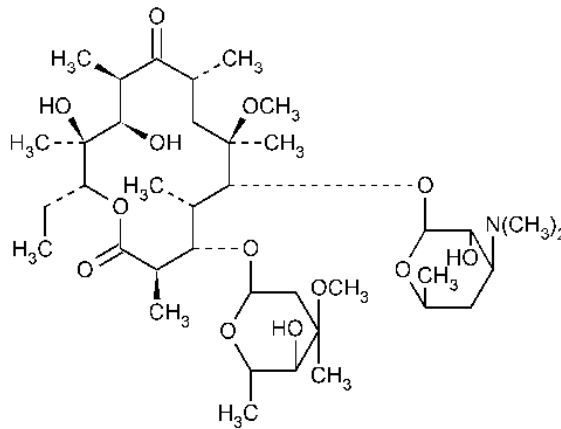
reaktif oksijen ürünlerinin üretimini katalize edilmesi nötrofillerde antimikrobiyal bir ajan olarak fonksiyon görür (87).

2.7. Lipit Peroksidasyonu Ve Malonaldehit (Mda)

Lipid peroksidasyonu hücre membranlarında oluşan serbest radikallerin en belirgib hasar verici özelliğidir. Bu radikaller lipid peroksidasyonunu indükleyerek yapısal ve fonksiyonel olarak hücre hasarına sebep olurlar(46). Malondialdehit, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif indikatörü olmamasına rağmen , lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi paralellik gösterir. Bu sebeple biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır (88).

2.8. Klaritromisin

Makrolid grubu antibiyotikler günümüzde yaygın olarak kullanılan antibiyotik türlerindendir. Eritromisin , klaritromisin , azitromisin ,sipiramisin bu antibiyotik ailesinin başlıca gelen üyelerindendir. Makrolidler 50S bakteriyel ribozoma etki ederek , peptidil transferazı inhibe edip , protein sentezini bozarak mikroorganizmalara etki ederler(16). Klaritromisin(CAM, 6-0 methylerythromycin) in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda hipoksiye toleransı artığını destekleyen bulgular bulunmaktadır. (17,18,19,20)(şekil 6). Ayrıca inflamatuvar süreçlerin azaltılmasında da etkisi olduğu, hayvan ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. (17,21,22,23,24).



Şekil 6: klaritromisin kimyasal yapısı

3. MATERYAL VE METOD

KTÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Tüm deney protokolleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2016/55 sayılı kararı ile). Biyokimyasal analizler Biyokimya anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada her biri ortalama 220–280 gr arasında olan 38 adet spraque dawley tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edilmiş su ve yem kısıtlaması olmaksızın standart koşullar altında ve ayrı ayrı kafeslerde izlendiler ve her sıçan yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlenmiştir.

3.2. Gruplar

Sıçanlar 4 ana gruba ayrıldı:

GRUP 1 (İSKEMİ +KLARİTROMİSİN): 12 sıçandan oluşan bu gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi + hipotansiyon (10ml/kg) yapıldıktan sonra her gün klaritromisin 100 mg/kg/gün intraperitoneal verildi. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı.10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

GRUP 2 (İSKEMİ): 12 sıçandan oluşan bu gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi+hipotansiyon(10ml/kg) oluşturuldu. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

GRUP 3 (SHAM /KONTROL): 7 sıçandan oluşan bu grubun 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı.10.gün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

GRUP 4 (PÜR KONTROL GRUP” SADECE ANESTEZİ VE İLAÇ VERİLECEK): 7 sıçandan oluşan bu gruba anestezi sonrası cilt laserasyonu yapıldı ve 10 gün boyunca klaritromisin intraperitoneal verildi. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

3.3. Metod

İskemi + klaritromisin grubundaki (Grup 1) sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; ratlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer) 30mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®; Adeka) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi sonrası ekartör yerleştirildi.



Resim 1 : Supine pozisyonunda paratrakeal alanların disseksiyonu

Bilateral paratrakeal alanlar künt disseksiyonla disseke edildi. A.carotis kommunisler ortaya konuldu (Resim 1).



Resim 2: A.Carotis Communise Yaşargil klibi yerleştirilmesi

A.Carotis Communisler N.vagustan ayrıldıktan sonra Yaşargil anevrizma klibi yerleştirildi, (Resim 2).



Resim 3: Bilateral A.Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klibi yerleştirilmesi

Bilateral A.Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klipi yerleştirildikten sonra 30 dk beklenildi, (Resim 3). Bu sırada intrakardiak yaklaşık 3cc (10ml/kg) kan alınıp hipotansiyon yaratıldı.30 dk sonunda klip çıkarıldıktan sonra arterial akım gözden geçirildi.



Resim 4:Sütüre edilmesi

30 dk sonunda klempiler çıkarıldı ve katlar usulüne uygun sütüre edildi, (Resim 4).



Resim 5: Sıçanların ayrı ayrı yerleştirilmesi

Sıçanlar ayrı ayrı numarandırılmış besin ve suya kolayca ulaşabilecekleri kafeslere yerleştirildi, (Resim 5-6).



Resim 6: Sıçanlar besin ve suya ulaşabileceği ayrı ayrı yaşam alanları

Sıçanların aralıklı olarak(1, 4, 7 ve 10.günlerde) nörolojik muayeneleri yapıldı.10 gün boyunca klaritromisin 100 mg/kg/gün hazırlanarak intraperitoneal olarak enjekte edildi.



Resim 7: Sakrifiye edilen ratların beyin dokusunun çıkarılması

10 gün sonra sağ kalan 10 sıçandan intrakardiyak 4cc kan alındı ve kurban edilip beyinleri çıkarıldı, (Resim 7).

Beynin hipokampus, c.striatum, corpus kallozum ve talamus kısmı ayrıldı, histolojik ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

İskemi grubundaki sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; sıçanlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer) 30mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10’luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi sonrası ekartör yerleştirildi. Bilateral paratrakeal alanlar künt disseksiyonla disseke edildi. A.carotis kommunisler ortaya konuldu. Bilateral A.Carotis Communisler N.vagustan ayrıldıktan sonra Yaşargil anevrizma klibi yerleştirildi. Bu sırada intrakardiyak 3cc (10ml/kg) kan alınıp hipotansiyon yaratıldı. 30 dk sonunda klip çıkarıldıktan sonra arterial akım gözden geçirildi. Arterial akımın varlığı teyid edilip katlar usulüne uygun kapatıldı. Post op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10. gün sonunda intrakardiyak 4cc kan alındı ve kurban edilip beyinleri çıkarıldı. Beynin hipokampus, c.striatum, corpus kallozum ve talamus kısmı ayrıldı. Biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

Pür kontrol grubundaki sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; sıçanlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®) 30 mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10’luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi yapıldı ve daha sonra suture edildi.10 gün boyunca klaritromisin verildi. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı.10 gün sonra intrakardiyak 4 cc kan alındıktan sonra kurban edildi. Beynin hipokampus,

c.striatum, corpus callosum ve talamus kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

Sham grubundaki sıçanların 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10. gün sonunda intrakardiyak 4 cc kan sitratlı tüplere alınıp sakrifiye edildi. Beynin hipokampus, c.striatum, corpus callosum ve talamus kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

Tüm gruplara postop 1.gün, 3.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda (sakrifiye edilmeden hemen önce) motor muayene yapıldı.

Beyinde oluşacak değişiklikler biyokimyasal olarak hem kan hem de dokuda malonaldehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesiyle değerlendirildi.

Beyinde iskemik alanları gösterebilmek maksadı ile iskemi oluşturulan sıçanların beyinleri histopatolojik inceleme için histoloji laboratuvarına gönderildi.

3.4. MALONDİALDEHİT TAYİNİ

3.4.1. Dokuda malondialdehit tayini:

MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyama yönteminin (89) düzenlenmiş şekli ile yapılmıştır. Bu yöntemde, MDA’nın asidik durumda tiyobarbitürik asit (TBA) ile ortaya çıkardığı bileşenin renginin 532 nm’deki absorbansının ölçümü şeklindedir.

3.4.2. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH:7.4): 10 adet PBS tableti (Mediano, Uppsala, Sweden) içerisinde yaklaşık 900 mL saf su içeren beherde çözüldü ardından çözeltinin pH’sı, pH metrede (Hanna Instrument, USA) 7.4’e olacak şekilde düzenlendi. pH’sı düzenlenen çözeltinin hacmi 1 L’ye olacak şekilde ayarlandı.

2) % 1’lik H₃PO₄ çözeltisi: Saf su üstüne 2.94 mL % 85’lik H₃PO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA) alındı ve hacim saf su ile 250 mL olacak şekilde ayarlandı.

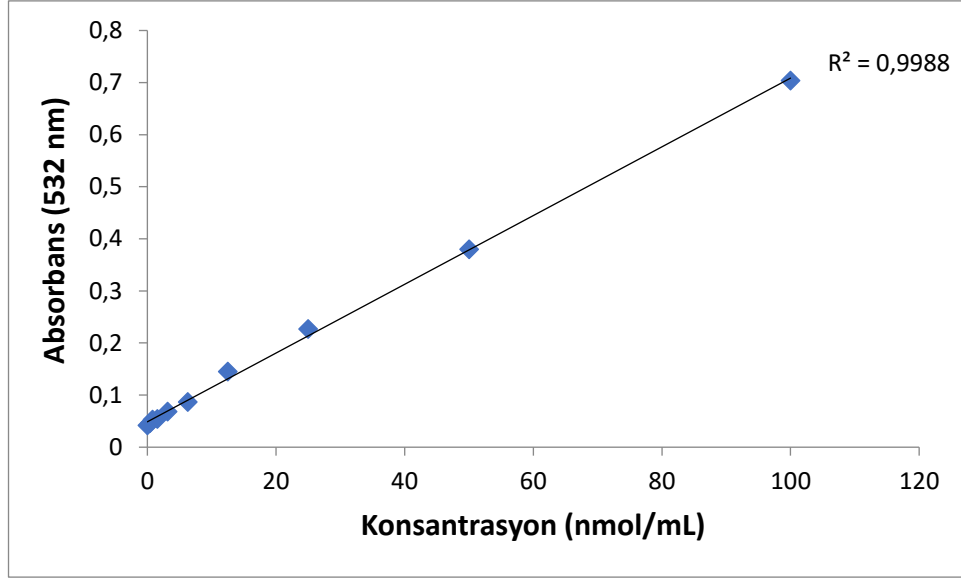
3) TBA çözeltisi: 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edildi magnetik barla karıştırılarak çözülmesi sağlandı.

4) Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. Çözeltinin 50°C’de 1 saat inkübasyonu sağlandı. Böylece hazırlanan ana stok çözeltisinden belirli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 ve 0.195 nmol/mL’lik kör ile birlikte standart çözeltiler yapıldı.

Örneklerin Hazırlanışı: Dokuların hepsinden yaklaşık olarak 50’şer mg’lık kesimler yapıldı. Daha sonra bu dokular 2 mL PBS içerisinde 9500 rpm (4x10s, 40°C)’de homejenizatör (Jane and Kunkel, Germany) ile homojenize olması sağlandı. Homojenatlar 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar 1:10 oranında PBS ile seyreltildikten sonra MDA değerleri ölçümleri yapıldı.

1.2. Doku MDA Ölçümü:

1. 500 µL homojenata 3 mL % 1’lik H₃PO₄ koyularak karışım yapıldı.
2. Karışıma 1 mL % 0.672’lik TBA eklenip karıştırıldı, sonra 60 dakika kaynar suda inkübe edildi.
3. Sürenin sonunda tüpler soğuması için oda sıcaklığına koyuldu ve daha 4000 rpm’de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrası süpernatant kısmından 200’er µL alınıp 96 kuyucuklu pleytlere dolduruldu mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu. Elde edilen standart absorban sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe yerleştirilip MDA standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten yararlanılarak doku MDA düzeyi nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı.



Şekil 7: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.4 3. Plazmada malondialdehit tayini:

Rat serum örnekleri biyokimyasal ölçümler yapılana kadar -80°C’de tutuldu. Serum örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu ile hesaplandı (90). Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon ile meydana gelen kırmızı renk spektrofotometrik şekilde ölçüm alındı. Tiyobarbitürikasit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünen bileşenleri ayırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfirik asit düzeneğinde ayrıldı.

3.4.4.Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) 0.084 N Sülfirik Asit (H_2SO_4): 577 μL % 97’lik H_2SO_4 (Sigma, St. Louis, MO, USA)’den alınıp, hacim deiyonize su ile 250 mL’ye tamamlandı.

2) % 10’luk Fosfotungstik Asit ($H_3(W_3O_{10}).4H_2O$): 5.55 g fosfotungstik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 mL deiyonize suda çözüldü.

3) Tiyoobarbitürük asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar ile karıştırılarak çözülmesi sağlandı.

4) Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. Çözeltinin 50°C’de 1 saat inkübasyonu yapıldı. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden belli miktarlarda dilüsyonlar hazırlanarak 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 ve 0.195 nmol/mL’lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

3.5. Serum MDA Ölçümü:

1. Deney tüplerine 150’şer µL serum, 1200’er µL H₂SO₄ ve 150’şer µL fosfotungstik asit eklendi, tüpler iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

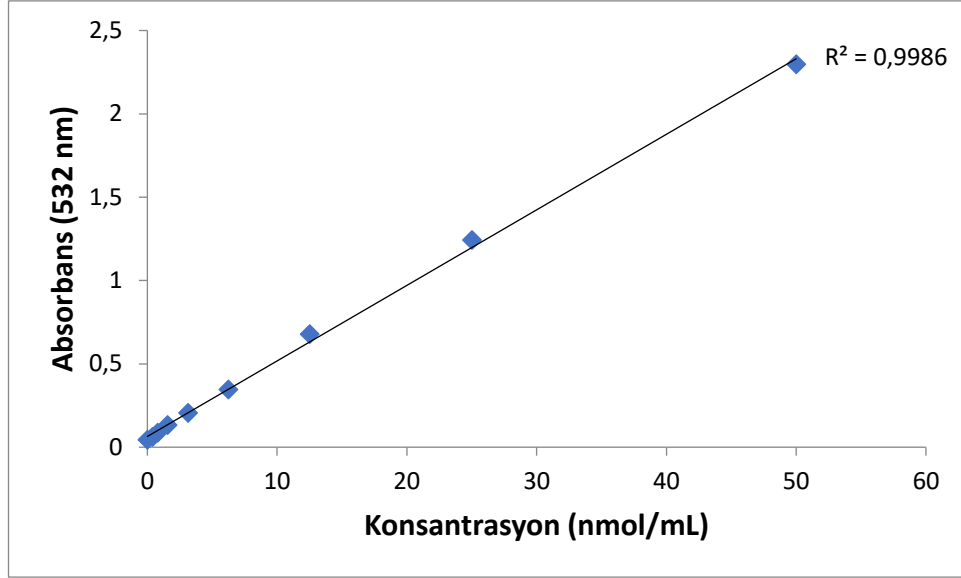
2. Karışımlar 1500 g’de 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazlar atıldı.

3. Geriye kalan çökelek kısımları üzerine 2’şer mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.

4. Tüplere 500’er µL TBA eklendi ve 1 saat 100°C’de inkübe edildi.

5. Inkübasyonun ardından tüpler 1000 g’de 10 dakika santrifüjlendi.

6. Üstteki berrak bölgeden 200’er µL alınarak 96 kuyucuklu pleytlere dolduruldu mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorpsanlar okunarak değerlendirildi. Ortaya çıkan standart absorpsan değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği yapıldı. Bu grafikten yararlanılıp serum MDA miktarı nmol/mL olarak hesaplandı.



Şekil 8: Serum MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.6. MOTOR MUAYENE

Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerde motor skorlarına aşağıdaki tablodaki gibi puan verildi, (Tablo 3).

Tablo 3: Bederson nörolojik muayene skalasına göre puanlama

Grade 0	Nörolojik defisit yok	5 puan
Grade 1	Ön bacaklarda flexiyon	4 puan
Grade 2	Dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç	3 puan
Grade 3	Grade 2'ye ilave olarak dönme hareketinin eklenmesi.	2 puan
Grade 4	Exitus	1 puan

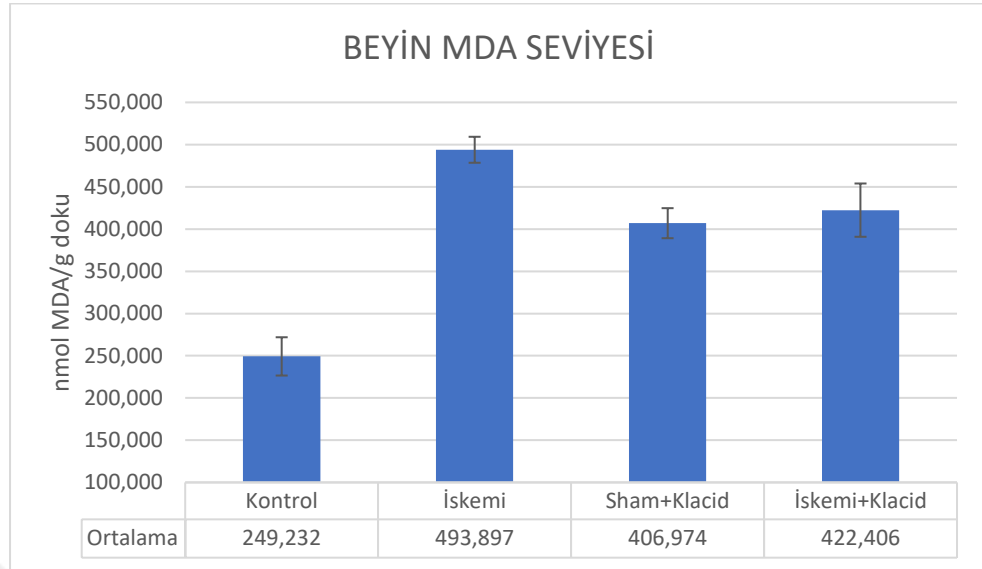
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistik analizler IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of

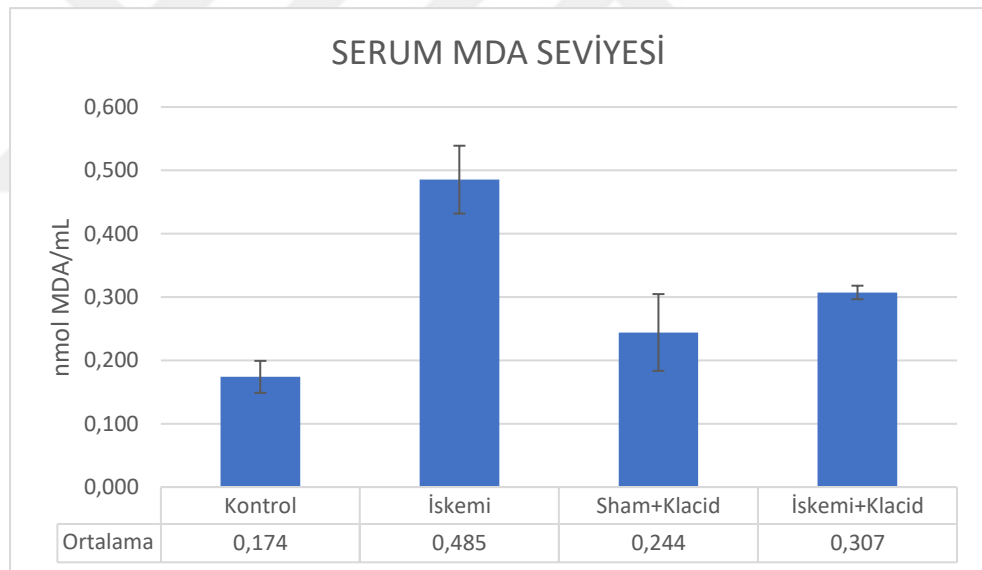
Variance (ANOVA)" testi ile belirlenmiş ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.



4. BULGULAR



Grafik 1: Doku MDA ortalamaları



Grafik 2: Serum MDA ortalamaları

Kontrol(sham) grubuna ait beyin MDA seviyesi ile kıyaslandığında iskemi grubu beyin dokusunda MDA seviyesinin önemli derecede yükseldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlara bakıldığında ratlarda yeterli iskeminin sağlandığı sonucuna varılmıştır. İlaç verilen grup ile iskemi grubu ile kıyaslandığında klaritromisin uygulamasının anlamlı şekilde MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Kontrol grubu Serum MDA seviyesi ile kıyaslandığında iskemi grubunun MDA seviyesi önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Yine bu sonuç anlamlı iskeminin sağlandığını göstermektedir. İlaç ve iskemi grubu değerleri kıyaslandığında serum MDA seviyesinde belirgin bir düşüş sağladığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson skorlarının median ve min-max değerleri

<u>Grup</u>	<u>1. Gün</u>		<u>4. Gün</u>		<u>7.Gün</u>		<u>10.Gün</u>	
	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.
İskemi+Klaritromisin	2.25	1-5	2.75	1-5	2.83	1-5	3.25	1-5
İskemi	2.16	2-5	2.25	2-5	2.33	1-5	2.41	1-5
Sham	4.85	4-5	5	5-5	5	5-5	5	5-5
Pür Kontrol	4.14	3-5	4.71	4-5	4.85	4-5	5	5-5

5. TARTIŞMA

İnme Dünya sağlık örgütünün yapmış olduğu tanıma göre ; ‘‘hızla gelişen ve 24 saat veya daha uzun süren mortaliteye sebep olabilen, beyin işlevlerin fokal veya global bozukluğuna bağlı semptomlar’’ olarak tanımlamaktadır (1,2,3). Stroke dünya çapında mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerindendir (4,5).2017 verilerine göre ABD yaklaşık olarak 795000 stroke vakası görülmektedir(6). Yine bu istatistik ışığında her 40 saniyede bir kişi stroke geçirmekte ve 4 dakikada bir kişi stroke sonucu hayatını kaybetmektedir(7,8). Türkiye ‘de 2001 yılında yapılan bir çalışmada, tüm hastalıklar içerisinde 2. en sık morlalite sebebi olduğu ortaya koyulmuştur(9) İnme olgularının %80-85’ i iskemik, %15-20’si hemorajik kökenlidir(10).

Mortalite ve morbiditesi bu denli önemli bir sağlık sorunu olması sebebiyle hastalığın patolojisi , tanı ve tedavi seçeneklerine yönelik birçok çalışma ve deneysel modeller kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar ile birçok önleyici ve tedavi edici yöntem halihazırda klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak önümüzde aşılması gereken birçok problem bulunmaktadır.

İskemi beyin dokusu giden kan akımı yetersizliği sonrası , dokunun ihtiyacı olan oksijen ve metabolitlere karşıyamaması sonrası meydana gelen patolojik bir durumdur. Nöronlar depo kabiliyetleri olmadığı için iskemiye aşırı duyarlıdır. İskemi sonrası beyinde perfüzyonun yeniden sağlanması ile de nöral dokuda reperfüzyon hasarı denilen yeni bir problem ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon hasarında oksidatif stres , lökosit infiltrasyonu , mitokondriyal mekanizmalar , platellet aktivasyonu , kompleman aktivasyonu , kan beyin bariyeri bozulması gibi bir takım patolojiler rol oynar ve bunlar beyin ödemi ve hemorajik transformasyonlara zemin hazırlayarak nöron disfonksiyonu ve ölümüne neden olurlar(66).

Serebral iskem-reperfüzyon hasar oluşumunu önlemek ve sonrasında oluşan hasarı ortadan kaldırmak amacıyla antiödem tedavi, glutamat reseptör antagonistleri, membran stabilizatörleri, serbest radikal gidericileri, kalsiyum kanal blokerleri, anti-inflamatuvar ve antiagregan ajanlar gibi pek çok yöntem kullanılmıştır(91).

İskemi süresince dokularda yapısal ve metabolik değişiklikler görülmeye başlanır(29). Dokuya ulaşan kan akımının azalması ile dokuda oluşan hücrede oksidatif fosforilasyon azalmaya ve bu durumun yansıması olarak adenozin-5 trifosfat(ATP) ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili moleküllerin sentezi azalır(30). Hücrede enerji depoları bu durum karşısında hızla boşalmaya başlar. Bu enerji açığının sonucu olarak hücre zarında bulunan Na^+ , K^+ -ATP az pompası çalışamaz hale gelir. Pompanın iş göremez hale gelmesi ile hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları hızla artmaya başlar(31). Hücre içindeki bu Ca^{2+} iyon konsantrasyonunda ki önlenemez artış artık hücre için sitotoksik bir durum oluşturur(32). Üstelik bu dönemde meydana gelen iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflatuar sitokinlerin lökosit yapışma bileşenlerinin yapımı ve göç etmelerinde artış, buna karşılık antioksidan enzim yapımında düşüş oluşur ki bu durum sonunda hücreyi, reperfüzyon dönemindeki problemlere duyarlı hale getirir (29). Özetle bahsetmek gerekirse inmeyi takipeden süreçte gelişen beyin hasarı oksidatif ve nitratif stres eksitotoksisite, iyonik dengesizlik, peri-enfarktüs depolarizasyon, asidotoksisite enflamasyon ve apoptozisi içeren birden fazla mekanizma ve yolların değişik seviyelerde rol alması sonucunda gelişir(33,34). Tüm bu durumların yanında nöronların bölgesel olarak da iskemi duyarlılıkları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Örnek vermek gerekirse gri cevher , korpus striatum , hipokampus CA1 serebellar purkinje hücrelerinin iskemiye daha duyarlı olduğu bilinmektedir(35).

Son yıllarda iskemin ve sonrasında gelişen reperfüzyon yaralanmasının patofizyolojisi araştırmak amacıyla, sıçanlarda bilateral karotis kommunis kliplenmesi ve hipotansiyon oluşturulması yaygın olarak kullanılmaktadır(15). Farklı hayvan türleri üzerinde deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu deneysel modeller arasında en çok kabul gören model, sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modelidir: İki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon ve eş zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 50 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır . Biz de çalışmamızda iki taraflı karotis klemplemesi + hipotansiyon modelini uygulayarak beyinde iskemi–reperfüzyon injürisi yaratarak daha önceki çalışmalarda hipoksiye toleransı artırarak nöroprotektif etkisi olan klaritromisin antibiotiğini denedik.

Çalışmamızda da güncel olarak kullanılan ve uygulanması kolay bir yöntem olması sebebiyle bu model tercih edilmiştir

İskemik stroke için pek çok komponent geliştirilmiştir, ancak akut SVO hastalarında klinik kullanımda beklenen etkiyi yapamamışlardır(92). Eritromisin Klaritromisin gibi makrolid antibiotikler antibakteriel ajan olarak uzun yıllardır bir çok alanda kullanılmaktadır. Birkaç yıl önce preklinik çalışmalarda eritromisinin klinik kullanımda ki dozlarının in vitro hipoksiye toleransı in vivo serebral iskemide toleransı uyardığı görülmüştür. Ayrıca eritromisinin çeşitli organlarda birçok enflamatuvar mekanizmaya etki ettiği görülmüştür(93,94). Bu özellik üzerinden yola çıkarak çalışmamızda doku ve serum MDA düzeyleri ölçülmüştür.

Kontrol(sham) grubuna ait beyin MDA seviyesi ile kıyaslandığında iskemi grubu beyin dokusunda MDA seviyesinin önemli derecede yükseldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlara bakıldığında ratlarda yeterli iskeminin sağlandığı sonucuna varılmıştır. iskemi grubu ile kıyaslandığında klaritromisin uygulamasının anlamlı şekilde MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Kontrol grubu Serum MDA seviyesi ile kıyaslandığında iskemi grubunun MDA seviyesi önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Yine bu sonuç anlamlı iskeminin sağlandığını göstermektedir. İskemi grubu ile kıyaslandığında klaritromisin uygulanan grupta serum MDA seviyesinde belirgin bir düşüş sağladığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ratların deneysel beyin iskemi ve reperfüzyon injurisinde klaritromisin etkileri adlı çalışmamızda ; bilateral karotis arter kliplenmesi ve intrakraniyal kan alınması sonucu hipotansiyon yapılarak ratlarda serebral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturuldu. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmelerde klaritromisinin iskemi reperfüzyon yaralanmasında doku ve kan MDA düzeylerinde anlamlı düşüş sağladığı ve iskemi reperfüzyon yaralanmasında etkinliğinin olduğu gösterildi.



7. KAYNAKLAR

1. Kıyan S , Öz Saraç M , Ersel M , Aksay E , Yürüktümen A , Musalar E , Çevrim Ö . Acil Servise Başvuran Akut İskemik İnme 124 Hastanın Geriye Yönelik Bir Yıllık İncelenmesi . Akademik Acil Tıp Dergisi 2009, Cilt:8 Sayı:3
2. Kumral E, Balkır K. İnme epidemiyolojisi. In: Balkan S, editör. Serebrovasküler hastalıklar. 1. baskı, Ankara: 1Güneş Kitabevi; 2002. s. 38-40.
3. Sacco PL. Vascular diseases. In: Merrit, Rowland LP, editors. Merrit's neurology. 10th ed. Hagerstown:1 Williams&Wilkins; 2000. p. 177-85.
4. Lin L, Wang X, Yu Z (2016) Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. Biochem Pharmacol (Los Angel) 5: 213. doi:10.4172/2167-0501.100021
5. Della-Morte D, Guadagni F, Palmirotta R, Testa G, Caso V, et al. (2012) Genetics of ischemic stroke, stroke-related risk factors, stroke precursors and treatments. Pharmacogenomics 13: 595-613.
6. Correction to: Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2017 Sep 5;136(10):e196. doi:10.1161/
7. Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS. Ischemia-reperfusion injury in stroke. Interv Neurol. 2013 Sep;1(3-4):185-99. doi: 10.1159/000353125. Review.
8. Hwang Y-H, Kim Y-W, Kim J, Kim Y-S, Park S-P, Suh C-K: Subacute neurological deterioration with selective axonal injury in patients with acute ischemic stroke following reperfusion of middle cerebral artery occlusion. Case Rep Neurol 2011; 3 : 199–202
9. Evci ED, Memis S, Ergin F, Beser E. A population-based study on awareness of stroke in Turkey. Eur J Neurol. 2007 May;14(5):517-22.
10. Lewandowski C, Barsan W. Treatment of acute ischemic stroke. Ann Emerg Med 2001;37:202-16.
11. Baird AE, Donnan GA, Austin MC, Fitt GJ, Davis SM, et al. (1994) Reperfusion after thrombolytic therapy in ischemic stroke measured by single-photon emission computed tomography. Stroke 25: 79-85.
12. . Beadell NC, Bazan T, Lutsep H (2015) The Year Embolectomy Won: a Review of Five Trials Assessing the Efficacy of Mechanical Intervention in Acute Stroke. Curr Cardiol Rep 17: 102.
13. Re-examining Acute Eligibility for Thrombolysis Task Force, Levine SR, Khatri P, Broderick JP, Grotta JC, et al. (2013) Review, historical context, and clarifications of the NINDS rt-PA stroke trials exclusion criteria: Part 1: rapidly improving stroke symptoms. Stroke 44: 2500-2505
14. J. Minnerup, B.A. Sutherland, A.M. Buchan, C. Kleinschnitz, Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives, Int. J. Mol. Sci. 13 (2012)11753–11772.

15. Eklof B, Siesjo B: The effect of bilateral carotid ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 86: 155-165, 1972
16. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jul;23(3):590-615. doi:10.1128/CMR.00078-09. Review.
17. Katayama Y, Inaba T, Nito C, Suda S, Ueda M. Neuroprotective effects of clarithromycin against neuronal damage in cerebral ischemia and in cultured neuronal cells after oxygen-glucose deprivation. *Life Sci.* 2017 Jan 1;168:7-15. doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.004. Epub 2016 Nov 5.
18. A.M. Brambrink, I.P. Koerner, K. Diehl, G. Strobel, R. Noppens, O. Kempfski, The antibiotic erythromycin induces tolerance against transient global cerebral ischemia in rats (pharmacologic preconditioning), *Anesthesiology* 104 (2006) 1208–1215.
19. R. Huber, K. Kasischke, A.C. Ludolph, M.W. Riepe, Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics, *Neuroreport* 10 (1999) 1543–1546.
20. I.P. Koerner, M. Gattling, R. Noppens, O. Kempfski, A.M. Brambrink, Induction of cerebral ischemic tolerance by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to ischemia and suppresses inflammation, *Anesthesiology* 106(2007) 538–547.
21. A. Azuma, T. Furuta, T. Enomoto, Y. Hashimoto, K. Uematsu, N. Nukariya, A. Murata, S. Kudoh, Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats, *Thorax* 53 (1998) 186–189.
22. S. Kudo, A. Azuma, M. Yamamoto, T. Izumi, M. Ando, Improvement of survival in patient with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) 1829–1832.
23. M.T. Labro, H. Abdelghaffar, Immunomodulation by macrolide antibiotics, *J. Chemother.* 13 (2001) 3–8.
24. K. Morikawa, J. Zhang, M. Nonaka, S. Morikawa, Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1- and Th2-type cytokine production, *Int. J. Antimicrob. Agents* 19(2002) 53–59.
25. Ropper AH, Brown RH. Serebrovasküler hastalıklar. Çoban O, Bebek N [Çeviri editörleri]. 8. baskı, Ankara: Güneş Kitapevi; 2006.
26. Anderson WAD, Kissane JM: Anderson Patoloji (Çev. A. Kaancıgil) Güven Yayınları, 1982, 262-267.
27. Stephan GW, Bruce RR: Hypoxic-ischemic injury of the white matter. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management.* Chapter 11, 1998.
28. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992
29. Şener, G., Yeğen, B. Ç. (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg.* 22(3), 5-13.

30. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-246.
31. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-64.
32. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S33-42.
33. Bambal, G., Kalaycı, G., & Ekici, F. Serebral İskemi Oluşum Mekanizmaları. *Tip Araştırmaları Dergisi*; 2015: 13(1):36-43
34. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55:310-318.
35. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;
36. Navarro RCE. Metabolismo cerebral en isquemia. En: Velez AH, Rojas MW, Borrero RJY, Restrepo MJ. Eds. *Fundamentos de medicina. Neurología*. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia 1991.
37. Buchan A. Advances in cerebral ischemia: experimental Approaches. *Neurol Clinics* 1992; 10:49-61.
38. López-Hernández EM, Solís H Cerebral ischemia: some secondary alterations and animal models. *Arch Neurocién (Mex)* 2005; 10: 160-1167.
39. Pendlebury ST, Giles MF, Rothwell PM Pathophysiology of acute cerebral ischemia.. *Transient Ischemic Attack and Stroke*. Cambridge University Press pp.49-54, 2009.
40. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological process in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurol Neurosurg*. 2009; 111:483- 495.
41. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:214–220.
42. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54:34-66.
43. Budd, S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol. Ther.*1998; 80, 203–229.
44. Mori, T., Tateishi, N., Kagamiishi, Y., Shimoda, T., Satoh, S., Ono, S., Katsube, N., Asano, T., 2004. Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-250696. *Neurochem. Int.* 45, 381–387.
45. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 54(11): 2089-94, 2000..

46. Üçüncü H. Sıçanların deneysel beyin iskemisi ve reperfüzyon yaralanmasında klotrimazol'un etkileri(tez). Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2011.
47. Global ischemia and behavioural deficits f. block*Department of Neurology Aachen, Pauwelsstraße 30, 52057 Aachen, Germany (Received 20 August 1998)
48. W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, *Stroke* 10 (1979) 267– 272.
49. M.L. Smith, G. Bendek, N. Dahlgren, I. Rosen, T. Wieloch, B.K.Siesjö, Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model, *Acta Neurol.Scand.* 69 (1984) 385– 401.
50. Yanagihara T. Experimental stroke in gerbils: Correlation of clinical,pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. *Stroke* 1978; 9:155–159.
51. Kirino, T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57±69.
52. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(3): 472-6.
53. Ökten A., Güzel, A. (2012). Beynin Arteriyel Anatomisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2012, Cilt: 22, Sayı: 3, 171-188
54. Heinz ER: History of Neuroradiology. *Neurosurgery*. Volume I. Wilkins RH, Rengachary SS (eds). Mc Graw Hill Companies,1996:13-14
55. Heros RC, Morcos JJ: Cerebrovascular surgery: Past, present, and future. *Neurosurgery* 47(5):1007-1033, 2000
56. Yaşargil MG: *Microneurosurgery*. Volum I. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag,1984:54
57. Ziyal Mİ: *Cerrahi Nöroanatomisi-Disseksiyon Atlası*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2007:10-22
58. Perlmutter D, Rhoton AL: Microsurgical anatomy of the anterior cerebral-anterior communicating-recurrent artery complex. *J Neurosurg* 45: 259-272, 1976
59. Rhoton AL Jr: *Cranial Anatomy and Surgical Approaches*. Philadelphia Lippincott: Williams&Wilkins, 2003:96-110
60. Garman, R. H. (2011). Histology of the central nervous system. *Toxicologic pathology*, 39(1), 22-35.
61. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. Second Edition: Philadelphia:WB Saunders Co, 2001;183-217
62. Snell RS. *Klinik Nöroanatomisi*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000;48-299
63. Clarke PGH. Developmental cell death, morphological diversity, and

- multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 1990; 181: 195–213.
64. Barr ML, Klerman JA. *The Human Nervous System*. (5th ed). Philadelphia: JB Lippincott Comp 1988; 266–9.
 65. Greenberg MS. *Handbook of Neurosurgery. Cerebral arterial anatomy*. Sixth edition. USA: Thieme; 2006.
 66. Sumii T, Lo EH (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33: 831-836.
 67. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Huttemann M (2013) Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiol* 47: 9-23.
 68. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189.
 69. Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, et al. (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38: 3000-3006.
 70. Nieminen AL (2003) Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol* 224: 29-55.
 71. Jemmerson R, Dubinsky JM, Brustovetsky N (2005) Cytochrome C release from CNS mitochondria and potential for clinical intervention in apoptosis-mediated CNS diseases. *Antioxid Redox Signal* 7: 1158-1172.
 72. Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T (1999) Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 736-741.
 73. Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, et al. (1999) The dynamin-related GTPase
 74. Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158: 445-452.
 75. Martinou JC, Youle RJ (2006) Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13: 1291-1295.
 76. Tanaka A, Youle RJ (2008) A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. *Mol Cell* 29: 409-410.
 77. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 49: 93-102.
 78. Kuroda S, Siesjö BK (1997) Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clinical Neuroscience* 4: 199-212.
 79. Zeller JA, Tschoepe D, Kessler C (1999) Circulating platelets show increased

- activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb Haemost* 81: 373-377.
80. Gawaz M (2004) Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 61: 498-511.
 81. Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL (2012) The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology* 217: 1026-1033.
 82. Barnum SR (1999) Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. *Mol Med* 5: 569-582.
 83. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan BP (1997) Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* 150: 31-41.
 84. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL (1999) Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 36: 941-948.
 85. D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES (2001) The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* 7: 367-382.
 86. Khatri R, McKinney AM, Swenson B, Janardhan V (2012) Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology* 79: S52-S57.
 87. Trush MA, Seed JL, Kensler TW. Oxidant-dependent metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by phorbol ester-stimulated human polymorphonuclear leukocytes: possible link between inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 5194-5198.
 88. Machlin JL, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J* 1987;1:441-445.
 89. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278.
 90. Yagi K (1984). Assay of blood plasma or serum. *Methods of Enzymology* 109: 328-331.
 91. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(2):267-282
 92. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2007;357:562-71.
 93. Huber R, Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics. *NeuroReport*. 1999;10:1543-6.
 94. Koerner IP, Gattling M, Noppens R, Kempinski O, Brambrink AM. Induction of cerebral ischemia by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to and suppresses inflammation. 2007;106:538-47.

