



**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ SONRASI
RİOCİGUAT VE RESVERATROL KOMBİNE TEDAVİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. BARIŞ ASLANOĞLU
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DİYARBAKIR-2021



**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSSEL SEREBRAL İSKEMİ SONRASI
RİOCİGUAT VE RESVERATROL KOMBİNE TEDAVİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. BARIŞ ASLANOĞLU
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. YAHYA TURAN**

DİYARBAKIR-2021

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerini bizden esirgemeyen bize sadece hocalık yapmayı aynı zamanda bizi hayata hazırlayan sayın Prof. Dr. Adnan CEVİZ ve sayın Prof. Dr. Tevfik YILMAZ hocalarıma bana kattıkları herşey için teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç.Dr. Yahya TURAN 'a teşekkürü borç bilirim.

Berber çalıştığım bilgi, hoşgörü ve sabrını benden esirgemeyen hocalarım Doç.Dr. Hüseyin ÖZEVREN'e ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim BAŞAR'a;

Birlikte çalışmaktan büyük keyif adığım, sadece asistanlık sürecinde değil hayatımın her alanında desteğini arkamda hissettiğim değerli Op. Dr. Kamuran AYDIN'a;

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve aynı ekipte olmaktan gurur duyduğum Op. Dr. Abdurrahman ARPA, Op. Dr. Barış GÜNGÖRMEZ, Op. Dr. Mesut KASIMOĞLU, Dr Sezer Onur GÜNARA, Dr. Burak ATLAS, Dr. Rıdvan ÇETİN, Dr. Mehmet Salih ATAMA, Dr. Aziz ÇEVİK, Dr. Abdullah YİĞİT, Dr. Abdulkadir KANKILIÇ, Dr. Barış ALTUN, Dr. Muhammed Mazlum KILIÇ, Dr. İsmail Behçet BAZ, bütün hemşire ve personellere;

Tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, histolojik incelemesini değerli zamanını ayırarak yapan ve ilgi ve özverisini esirgemeyen Dr. Uğur ŞEKER'e;

Bugünlere gelmemi sağlayan ve maddi manevi her zaman yanımda olan değerli anneme, babama, Ateş, Şahin ve Zülfiye ASLANOĞLU'na;

Asistanlık döneminin en zorlu yılı olan ilk yılında benimle birlikte nöbetler tutan, bana olan inancını her fırsatta dile getiren, kızımızı tek başına büyüten sevgili eşim Zeynep İrem Aslanoğlu'na ve hayatımıza girmesiyle moral ve motivasyon kaynağım olan canım kızım Elif Derin'e minnet ve şükranlarımı sunarım. Saygı ve teşekkürlerimle.

Dr.Barış ASLANOĞLU, DİYARBAKIR 2021

Bu tez Dicle Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. (Projen:TIP.21.013)

ÖZET

Ratlarda deneysel serebral iskemi sonrası riociguat ve resveratrol kombine tedavinin nöroprotektif etkilerinin araştırılması

Barış ASLANOĞLU, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

Giriş ve Amaç: Vasküler patolojiler dışında başka bir neden olmadan meydana gelen beynin işlevsel fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanan inme en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Hemorajik ve iskemik olmak üzere iki grupta incelenir. İnmelerin yaklaşık %88'ini oluşturan iskemik inmelerin büyük çoğunluğu MCA'nın beslediği bölgelerde görülür. Günümüzde iskemik inme tedavisinde 2 tedavi yaklaşımı ön plana çıkmaktadır. Bunlar nöroproteksiyon ve rekanalizasyondur. Rekanalizasyonda onaylanan tek medikal tedavi rtPA'dır. İskemik inmeden sonraki ilk 4,5 saatte kullanılabilmesi nedeniyle kullanımı oldukça sınırlıdır. Bu nedenle daha geniş kullanımı olabilen tedaviler için çalışmalar devam etmektedir.

İskemik inmede birçok karmaşık mekanizma rol almaktadır. Nöroproteksiyon bu moleküler ve biyokimyasal olayların engellenip veya yavaşlatılmasıyla iskemiye karşı beyni koruma çabasıdır. Bu amaçla anti eksitotoksisite, antioksidan, anti inflamatuvar, anti apoptotik ajanlar kullanılmıştır.

Başlıca üzümde, kırmızı şarapta, yer fıstığında bulunan resveratrol nöroprotektif, antiinflamatuvar, antikanserojenik, kardioprotektif olmak üzere birçok etkisi olan bir fitoaleksindir.

Vasküler düz kasların gevşemesine neden olan bir guanilatsiklaz stimulatörü olan riociguat kardiyak çalışmalarda iskemik alanı küçülttüğü gösterilmesine rağmen serebral iskemide henüz çalışılmamış bir vazodilatatördür.

Bu iki ilaç kombinasyonunun serebral iskemi sonrası etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda rastgele seçilmiş ağırlıkları $328,53 \pm 47,20$ olan 35 adet Wistar albino cinsi dişi ratlar kullanıldı. 80 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin ile anestezi verildikten sonra sağ external karotid arterden girilerek internal karotid artere yönlendirilen suture ileletilerek MCA oklüzyonu sağlandı. 2 saat

bekletilip iskemi oluşturduktan sonra sütün geri çekilerek reperfüzyon sağlandı. Ratlar 7'li 5 gruba ayrıldı. 1. grup hiçbir işlem yapılmayan grup, 2. Grup iskemi oluşturulan grup, 3. Grup iskemi sonrası riociguat verilen grup, 4. Grup iskemi sonrası resveratrol verilen grup ve son olarak 5. Grup iskemi sonrası resveratrol + riociguat verilen grup olarak ayrıldı. Resveratrol (p.o.) 30 mg/kg/gün dozunda riociguat(i.p.) ise 10 mg/kg/gün dozunda 2 gün verildi. Tedavilerden sonra tekrar anestezi verilen ratlar sakrifikasyondan önce torakotomi yöntemiyle intrakardiyak kanları alındı. Sağ hemisferler %10'luk formaldehit içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi.

Alınan kesitler hemtatoksilen & eosin ile boyandı. Kesitlerde hücre çekirdeklerinde piknozis, perivasküler ve perinöral ödem, vasküler dilatasyon, konjesyon, reperfüzyon sonrası kanama odakları değerlendirildi. Ayrıca alınan kesitler parafin bloklarına gömülüp üzerlerine bax ve bcl-2 antikoları damlatılarak sinyal oluşumları gözlemlendi.

Bulgular: Çalışmamızda beyin dokusunda hemoraji alanları, nöron ve glial hücre çekirdeklerinde piknozis, perinöral ve perivasküler ödem, damar lümenlerindeki konjesyon, bax ve bcl-2 ekspresyonlarına bakıldı. İskemi grubunda fokal ve diffuz hemoraji alanları, nöron ve glial hücrelerde piknotik çekirdekli hücrelerde artış, perinöral ödem, damar lümeninde konjesyon, aşırı bax ekspresyonu ve bcl-2 immunopozivitesinde kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi. İskemi sonrası riociguat verilen grupta ise hemorajik alanların kaybolduğu, nöron ve glial hücrelerde piknotik çekirdekli hücrelerin oldukça azaldığı, damarların dilate olduğu, konjesyonun görülmediği, perivasküler ödemin oldukça azaldığı, bax immunopozivitesi azalıp kontrol grubuyla benzer olduğu, bcl-2 immunopozivitesi ise özellikle aksonlarda arttığı gözlemlendi. İskemi sonrası resveratrol verilen grupta ise hemorajik alanların önemli oranda azaldığı, konjesyon, perinöral ödem, nöron ve glial hücrelerde piknozis görülse de iskemi grubuna göre oldukça azaldığı görüldü. Bax immunopozivitesi kontrol grubuyla benzerlik gösterirken bcl-2 immunopozitifliği kontrol ve iskemi gruplarına benzer lokalize olmuştu ancak pozitifliğin özellikle sinir liflerinde kontrol grubuna daha yakın olduğu görüldü. İskemi sonrası riociguat ve resveratrol verilen grupta ise damarların dilate olduğu, nöron ve glial hücrelerde piknotik çekirdekli hücrelerin azaldığı perinöral ve perivasküler ödemin kaybolduğu

gözelemlendi. Kombine tedavi verilen grupta bax immunopozivitesi yok denecek kadar az iken bcl-2 immunopozivitesi iskemi gruplarına göre oldukça yoğun olduğu görüldü.

Sonuç: İskemik inmede riociguat ve resveratrol kombine tedavisinin nöroprotektif olduğu, apoptozu önlediği ve reperfüzyon sonrası kanamayı azalttığı görülmüş olup iskemik inme tedavi protokollerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Riociguat, Resveratrol, Nöroprotektif, Apoptoz



ABSTRACT

Investigation of neuroprotective effects of combined treatment of riociguat and resveratrol after cerebral ischemia in rats.

Bariş ASLANOĞLU, Dicle University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Diyarbakır

Introduction and Aim: Stroke, which is defined as functional dysfunction of the brain that occurs without any cause other than vascular pathologies, is among the most important causes of mortality and morbidity. It is divided into two groups as hemorrhagic and ischemic. The majority of ischemic strokes, which account for approximately 88% of strokes, occur in areas fed by MCA. Today, two treatment approaches come to the fore in the treatment of ischemic stroke. These are neuroprotection and recanalization. The only medical therapy approved in recanalization is rtPA. Since it can be used in the first 4.5 hours after ischemic stroke, its usage is quite limited. Therefore, studies are continuing for treatments that may have wider use.

Many complex mechanisms play a role in ischemic stroke. Neuroprotection is the effort to protect the brain against ischemia by inhibiting or slowing down these molecular and biochemical events. For this purpose, anti-excitotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic agents were used in the treatment.

Resveratrol, which is mainly found in grapes, red wine, and peanuts, is a phytoalexin with many effects such as neuroprotective, anti-inflammatory, anticarcinogenic, cardioprotective.

Riociguat, a guanylatecyclase stimulator that causes relaxation of vascular smooth muscle, is a vasodilator that has not yet been studied in cerebral ischemia, which reduces the ischemic area in cardiac ischemia studies.

We investigated the effects of these two drug combinations after cerebral ischemia.

Materials and Methods: In our study, 35 Wistar albino female rats with randomly selected weights of 328.53 ± 47.20 were used. After anesthesia with 80 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine, MCA occlusion was created by advancing the suture directed to the internal carotid artery by entering through the right external

carotid artery. After waiting for 2 hours and creating ischemia, the suture was withdrawn and reperfusion was provided. Rats were divided into 5 and each group involves 7 rats. Group 1 was the group had no procedure, Group 2 was the ischemia group, Group 3 was the group given riociguat after ischemia, Group 4 was the group given resveratrol after ischemia, and finally Group 5 was the group given resveratrol + riociguat after ischemia. Resveratrol (p.o.) was given at a dose of 30 mg/kg/day and riociguat (i.p.) was given at a dose of 10 mg/kg/day for 2 days. Intracardiac blood was taken by thoracotomy method before sacrifice of the rats which were re-anesthetized after the treatments. Right hemispheres were fixed in 10% formaldehyde at room temperature.

Sections taken were stained with hematoxylin & eosin. Pycnosis in the cell nuclei, perivascular and perineural edema, vascular dilatation, congestion, and bleeding foci after reperfusion were evaluated in the sections. In addition, the sections taken were embedded in paraffin blocks and bax and bcl-2 antibodies were dripped on them to observe signal formation.

Results: In our study, hemorrhagic areas in brain tissue, pycnosis in neuron and glial cell nuclei, perineural and perivascular edema, congestion in vessel lumens, bax and bcl-2 expressions were examined. In the ischemia group, focal and diffuse hemorrhagic areas, increase in pycnotic nucleated cells in neuron and glial cells, perineural edema, congestion in the vessel lumen, over-expression of bax and increase in bcl-2 immunopositivity were observed. In the group given riociguat after ischemia, it was observed that hemorrhagic areas disappeared, pycnotic cells in neurons and glial cells were considerably reduced, vessels were dilated, congestion was not observed, perivascular edema was considerably reduced, bax immunopositivity was reduced and was similar to the control group, and bcl-2 immunopositivity increased especially in axons. In the group given resveratrol after ischemia, although hemorrhagic areas decreased significantly, congestion, perineural edema, and pycnosis in neurons and glial cells were observed, it was considerably reduced compared to the ischemia group. Bax immunopositivity was similar to the control group, while bcl-2 immunopositivity was localized similar to the control and ischemia groups, but positivity was found to be closer to the control group, especially in nerve fibers. In the group given riociguat and resveratrol after ischemia, it was

observed that the vessels were dilated, the cells with pycnotic nuclei in neurons and glial cells decreased, and the perineural and perivascular areas disappeared. While bax immunopositivity was negligible in the combined treatment group, bcl-2 immunopositivity was found to be quite intense compared to the ischemia groups.

Conclusion: It has been seen that riociguat and resveratrol combined treatment in ischemic stroke is neuroprotective, prevents apoptosis and reduces post-reperfusion bleeding, and it has been concluded that it can be used in ischemic stroke treatment protocols.

Keywords: Ischemia, Riociguat, Resveratrol, Neuroprotective, Apoptosis



ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

ŞEKİL 1. İnme sınıflaması

ŞEKİL 2. Otoregülasyonun düzenlenmesi

ŞEKİL 3. Serebrovasküler kontrolün kompleks mekanizmalarla düzenlenmesi

ŞEKİL 4. Resveratrolün kimyasal yapısı

ŞEKİL 5. Riociguatın kimyasal yapısı

ŞEKİL 6. Riociguatın etki mekanizması

RESİM 1. Çalışmamızda kullandığımız riociguat

RESİM 2. Çalışmamızda kullandığımız resveratrol

RESİM 3. Cerrahi alanın boyanması, örtünmesi ve horizontal cilt insizyonu

RESİM 4. Sternohyoid ve sternomastoid kaslar

RESİM 5. Karotis kommunis ve nergus vagus

RESİM 6. Karotis interna ve karotis externa

RESİM 7. Nervus vagus

RESİM 8. External karotid arterin distalden bağlanması

RESİM 9. External karotid arterin proksimalden gevşek bağlanması

RESİM 10. Karotis kommunis ve internanın klipslerle geçici kapatılması

RESİM 11. Karotis externadan sütünun ilerletilmesi ve karotis internaya yönlendirilmesi

RESİM 12. Geçici klipslerin çıkarılması

RESİM 13. Tabakaların usulüne uygun kapatılması

RESİM 14. Rat beyninin üstten görüntüsü

RESİM 15. Rat beyninin yandan görüntüsü

RESİM 16. Rat beyninin bazal görüntüsü

RESİM 17. Kontrol grubu kesitlerin H&E ile boyanması küçük büyütme

RESİM 18. Kontrol grubu kesitlerin H&E ile boyanması büyük büyütme

RESİM 19. İskemi grubu kesitlerin H&E ile boyanması küçük büyütme

RESİM 20. İskemi grubu kesitlerin H&E ile boyanması büyük büyütme

RESİM 21. Resverstrol grubu kesitlerin H&E ile boyanması küçük büyütme

- RESİM 22.** Resverstrol grubu kesitlerin H&E ile boyanması büyük büyütme
- RESİM 23.** Riociguat grubu kesitlerin H&E ile boyanması küçük büyütme
- RESİM 24.** Riociguat grubu kesitlerin H&E ile boyanması büyük büyütme
- RESİM 25.** Resverstrol + riociguat grubu kesitlerin H&E ile boyanması küçük büyütme
- RESİM 26.** Resverstrol + riociguat grubu kesitlerin H&E ile boyanması büyük büyütme
- RESİM 27.** Kontrol grubunda bax immunohistokimya
- RESİM 28.** Kontrol grubunda bcl-2 immunohistokimya
- RESİM 29.** İskemi grubunda bax immunohistokimya
- RESİM 30.** İskemi grubunda bcl-2 immunohistokimya
- RESİM 31.** Resverstrol grubunda bax immunohistokimya
- RESİM 32.** Resverstrol grubunda bcl-2 immunohistokimya
- RESİM 33.** Riociguat grubunda bax immunohistokimya
- RESİM 34.** Riociguat grubunda bcl-2 immunohistokimya
- RESİM 35.** Riociguat + resverstrol grubunda bax immunohistokimya
- RESİM 36.** Riociguat + resverstrol grubunda bcl-2 immunohistokimya

KISALTMA LİSTESİ

ATP : Adenozin trifosfat

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DSÖ : Dünya sağlık örgütü

NO : Nitrik oksit

cGC : siklik Guanilat siklaz

cGMP : siklik Guanozin monofosfat

MI : Miyokard enfarktüsü

TNF : Tümör nekroz faktörü

TOAST : Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

CRP : C reaktif protein

HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein

LDL : Düşük yoğunluklu lipoprotein

TİA : Geçici iskemik atak

HT : Hipertansiyon

AHA : American Heart Association

ASA : American Stroke Association

CO : Karbonmonooksit

BT : Bilgisayarlı tomografi

MRG : Manyetik rezonans görüntüleme

DWI : Diffusion-weighted imaging

FLAIR : Fluid-attenuated inversion recovery

ADC : Apparent diffusion coefficient

PET : Pozitron emisyon tomografisi

SPECT : Single-photon emission computerized tomography

LGE- MRI : Late Gadolinium Enhancement - manyetik rezonans imagine

BNP : Brain natriuretic peptide

İYE : İdrar yolu enfeksiyonu

DVT : Derin ven trombozu

DMAH : Düşük molekül ağırlıklı heparin

SH : Standart heparin

IU : İnternational unit
İNR : İnternational normalized ratio
aPTT : Activated partial thromboplastin time
PT : Prothrombin time
İKA : İnternal karotid arter
AKomA : Anterior kommunikan arter
MCA : Middle cerebral artery
PSA : Posterior serebral arter
PKomA : Posterior kommunikan arter
CMRO2 : Cerebral metabolic rate of oxygen
NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDA : N-metil-D-aspartat
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
KBB : Kan beyin bariyeri
MMP : Matrix metalloproteinaz
BAX : Bcl-2-associated X protein
BCL-2 : B-cell lymphoma 2
SOD : Superoksid dismutaz
NOX : NADPH oxidaz
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor
IGF-1 : Insulin Like Growth Factor-1
CAM: Cell adhesion molecules
MCAo : MCA oklüzyon
KCL : Potasyum klorür
CPR: Cardiopulmonary resuscitation
IUPAC : İnternational union of pure and applied chemistry
DMSO : Dimetil sülfoksit
PI3K : Fosfotidilinositol 3-kinaz
JAK : Janus kinase
STAT : Signal transducer and activator of transcription
AIF : Apoptosis Inducing Factor

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	v
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	viii
KISALTIMA LİSTESİ.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemik İnme	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. İnme sınıflaması	4
2.1.3. Risk faktörleri.....	6
2.1.4. Radyolojik bulgular	9
2.1.5. Komplikasyonlar	11
2.1.6. İskemik inmenin tedavisi	14
2.2. Serebral Kan akımı ve Otoregülasyon.....	15
2.2.1. Beynin Ana Arterleri	15
2.2.2. Otoregülasyon	20
a) Otoregülasyon Mekanizmaları	21
b) Kan akışı - serebral metabolizma ilişkisi	22
c) Serebral kan akımının düzenlenmesi	22
d) Endotel	24
e) Astrositler	24

2.3. İskemik İnmede Patofizyoloji	24
2.3.1. Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği.....	25
2.3.2. İskemik çekirdek ve penumbra	25
2.3.3. Eksitotoksisite	26
2.3.4. Oksidatif stres.....	26
2.3.5. Kan Beyin Bariyer Bozukluğu	27
2.3.6. Mikrovasküler hasar	27
2.3.7. Hiperkoagülasyon ve trombosit aktivasyonu	28
2.3.8. İnflamasyon.....	28
2.3.9. Hücre ölümü	30
2.3.10. Reperfüzyon hasarı	31
2.4. İskemik İnmede Nöroproteksiyon.....	31
2.5. Deneysel Serebral İskemi Modelleri	35
2.5.1. Fokal Serebral İskemik İnme Modelleri	35
2.5.2. Global Serebral İskemik İnme Modelleri	38
2.6. İlaçlar	40
2.6.1. Resveratrol	40
2.6.2. Riociguat	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Deney Grupları.....	45
3.2. Anestezi	49
3.3. Cerrahi İşlem.....	49
3.4. Sakrifikasyon	60
3.5. Histopatolojik Değerlendirmeler.....	63

3.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	64
4. BULGULAR	65
4.1. Histopatolojik Değerlendirmeler.....	65
4.1.1. Hematoksilen&Eosin Bulguları	65
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	75
5. TARTIŞMA.....	87
6. SONUÇ	93
7. KAYNAKLAR.....	94

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından vasküler patolojilere bağlı meydana gelen serebral fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanan inme en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Yaşlanan toplumlarla beraber artan sigara, obezite, diyabet gibi faktörlere bağlı olarak da giderek artmaktadır. İnme, hemorajik ve iskemik olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Bunların yaklaşık %88'ini iskemik inmeler oluşturmaktadır. İskemik inmelerin temelini belirli bölgeleri besleyen arterlerde çeşitli nedenlerle ortaya çıkan tıkanmalar oluşturmaktadır. Tıkanma sonucu arterin beslediği alanın beslenememesine bağlı olarak serebral iskemi ortaya çıkmaktadır. Serebral iskeminin risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, etnik köken, genetik gibi değiştirilemeyen risk faktörleri ve sigara, obezite, alkol, hipertansiyon, diyabet, diyet gibi değiştirilebilen risk faktörleri yer almaktadır.

Karmaşık bir patogeneze sahip olan iskemik inmede süreç serebral arterin tıkanıp hücrelerin yeterli oksijen ve beslenme ürünleri alamamasıyla başlar. Enerjisinin neredeyse tamamını oksidatif fosforilasyonla sağlayan beyin yeterince beslenemeyince hücrelerde aerobik solunum baskılanır. Hücreler yetersiz ATP durumunda anaerobik solunum yapar. Azalan ATP sonucu hücrelerdeki iyon pompaları bozulur. Nöron ve glial hücrelerde depolarizasyon meydana gelir. Anaerobik solunum sonucu ise laktat artar. Bozulan iyon pompaları sonucu hücre içine sodyum, klor, kalsiyum girişi artarken; hücre dışına ise potasyum çıkar. Yetersiz enerji varlığında eksitator nörotransmitterler özellikle de glutamat salınır. Hücre dışında artan glutamat, reseptörlerine bağlanarak hücre içine daha fazla sodyum, klor, kalsiyum girşini sağlar. Böylece depolarizasyon daha da artmaya başlar. Hücre içinde artan kalsiyum, birçok enzim sistemini aktifleyerek mitokondriyal ve endoplazmik retikulum hasarına, hücre membran hasarına, serbest radikal oluşumuna, DNA hasarına, hücre şişmesine ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Hücre ölümü apoptozis, nekroz, nekroptoz ve piroptozis mekanizmalarıyla olmaktadır.

İskemik inmede nekrotik dokulara karşı inflamatuvar bir yanıt oluşur. Özellikle ilk 24 saatte kurtarılabilir doku olan penumbra çevresinde çeşitli sistemlerin birbirlerini tetiklemesi sonucu immun hücreler toplanır.

İskemik hasarla sonuçlanabilecek olayların engellenip veya yavaşlatılmasıyla hücrelerin iskemiden korunmasına nöroproteksiyon denir. Nöroproteksiyonda temel hedef hücre ölümlerin tamamen gerçekleşmediği alan olan penumbradır. Deney hayvanlarında oldukça etkili olan nöroprotektif ajanlar insanlarda beklenen etkiyi gösterememiştir. Bu nedenle standardize edilmiş nöroprotektif bir ajan yoktur. Nöroprotektif ajanların temel hedefi hücre ölüm mekanizma basamaklarıdır. Antioksidan, antiinflamatuvar, anti eksitotoksisite, anti apoptozis etkili nöroprotektif ajanlar hala çalışma aşamasındadır.

Riociguat, DSÖ tarafından pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisi için onaylanmış guanilat siklazı aktive eden bir ilaçtır. Bunu NO-guanilat siklaz- cGMP yolağına 2 yolla etki ederek yapmaktadır. Guanilat siklazı doğrudan uyararak ve gualinat siklazı güçlü vazodilatatör olan NO'e duyarlı hale getirerek yapmaktadır. NO, vasküler düz kaslardaki guanilat siklaza bağlanarak guanilat monofosfat (cGMP) üretimini artırır. Aktivitesi artan guanilat monofosfat vazodilatasyon yapar. Oral kullanılan bir ilaç olan riociguat bir çalışmada kardiyak MI da kullanılmış olup enfarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (102).

Resveratrol; sebzelerde, meyvelerde bulunan ve nöroprotektif etkinlik açısından oldukça sık çalışılan polifenoldür. Resveratrol aynı zamanda antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan etkinlik göstermektedir. Antioksidan özelliğini hidroksil-, süperoksit- gibi serbest oksijen radikallerini temizleyerek gösterir. Yapılan çalışmalarda resveratrolün nötrofil infiltrasyonu ve TNF- α üretimini inhibe ederek serebral iskemi / reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda resveratrolün apoptozu azalttığı da gösterilmiştir (99).

Çalışmamızda riociguat ve resveratrol kombine tedavinin ratlarda deneysel oluşturulan serebral iskemi üzerindeki etkinliğini histopatolojik ve immunohistokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemik İnme

Dünya Sağlık Örgütü, inmeyi; vasküler patolojiye bağlı meydana gelen serebral fonksiyon bozukluğu olarak tanımlar. Vasküler patolojiler dışında meydana gelen iskemi bu tanım dışında tutulmaktadır. İnmeler, hemoraji ya da iskemi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun yaklaşık %88'ini iskemik inmeler oluşturmaktadır. iskemik inmelerin ise yaklaşık %70'ini orta serebral arter oklüzyonuna bağlı gelişmektedir.

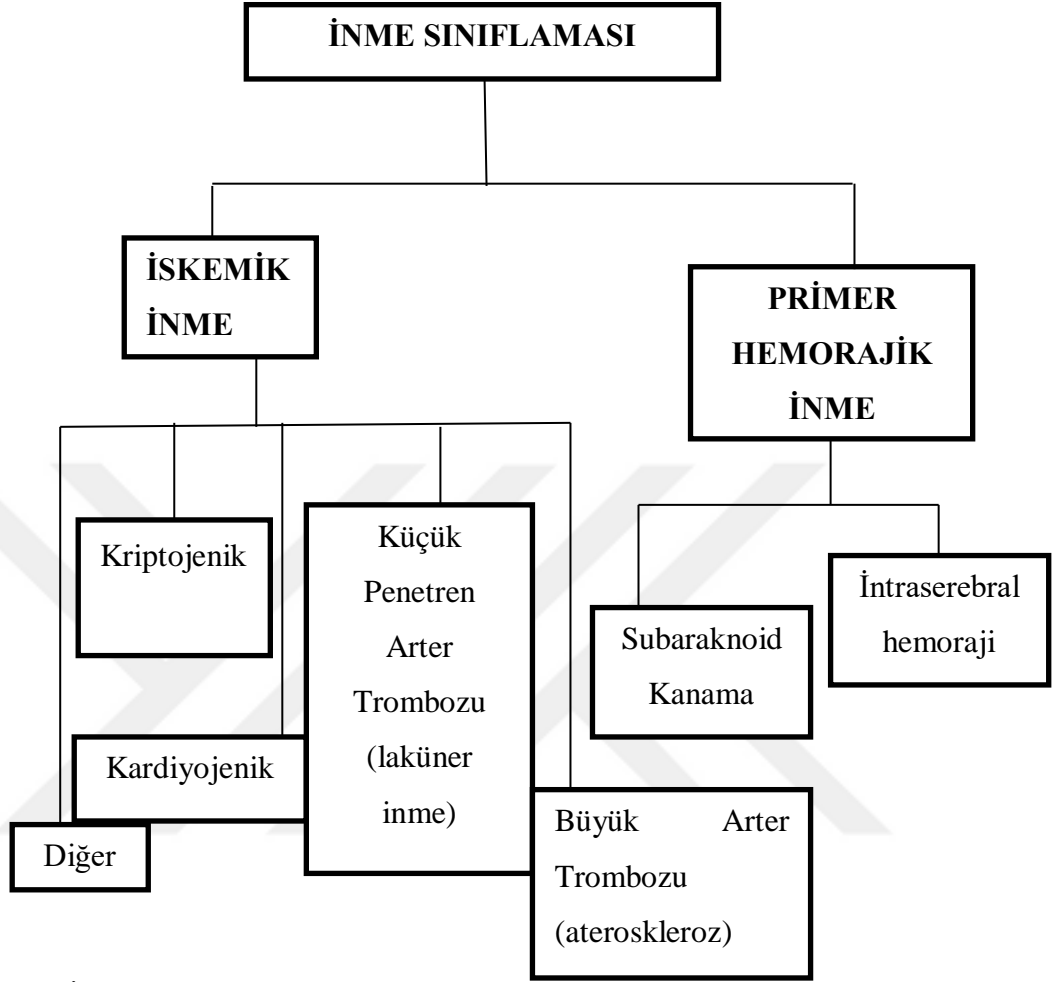
2.1.1. Epidemiyoloji

İskemi günümüzde mortalitenin en sık 2. nedenidir (iskemik kalp hastalığından sonra). Yılda yaklaşık 13.7 milyon insanı etkilemekte ve yaklaşık 5.5 milyon ölüm görülmektedir (1). 1970'den 2008'e kadar olan veriler değerlendirildiğinde düşük ve orta gelirli ülkelerde inme insidansı %100 artarken gelişmiş ülkelerde %42 düşüş göstermektedir (2).

İnme insidansı yaşla birlikte artmakla beraber 55 yaşından sonra 2 katına çıkmaktadır (1).

Cinsiyet arasında da erkeklerde kadınlara göre insidans %33, prevalans %41 daha fazla görülür ancak kadınlarda daha ağır klinik tabloyla seyreder. Yaş ilerledikçe erkek baskınlığı artmaktadır. İlk inme yaşı erkeklerde ortalama 68 iken kadınlarda ortalama 72' dir (3).

2.1.2. İnme sınıflaması



Şekil 1. İnme sınıflaması

İnme temel olarak 2 gruba ayrılır: İskemik inme ve hemorajik inme. Diğer sınıflamalar bu temel sınıflama esas alınarak yapılmaktadır.

Subaraknoid hemoraji nedenli inme, tüm inmelerin % 5'ini oluşturmaktadır iken intraserebral hemorajili inme ise tüm inmelerin % 10'nunu oluşturmaktadır.

Akut iskemik inmenin alt tiplerini belirlemek için Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) sınıflaması oluşturulmuştur (4,5).

TOAST

1. Büyük damar ateroskerozu (emboli, tromboz)

Ateroskleroz, karotisin dallanma yerlerinde, proksimalinde, kavernöz sinüsün parçası olan sifonda sık görülür. Tüm inmelerin %50'sini oluşturmaktadır. Kadın, ileri yaş, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesterolemi ateroskleroz için risk faktörleridir. Afazi, motor defisit, serebellar disfonksiyon veya beyin sapı etkilenmesi gibi klinik sonuçlarla kendini gösterir. CT / MRG'de 1.5 cm'den geniş enfarkt alanı büyük damar aterosklerozunu düşündürmelidir. Tanıda kardioemboli ekarte edilmelidir.

2. Kardiyembolizm

İskemik inmelerin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Embolinin kaynağı atriyal ve ventriküler duvar veya sol kalp kapakçığıdır. Bunlar dışında myokardiyal enfarktüs, protez kalp kapakçığı, atrial fibrilasyon emboli nedenleri arasındadır. Emboli en sık orta serebral arter ve posterior serebral arter veya dallarını etkiler. Anterior serebral arteri daha az etkiler. Klinik ve radyolojik olarak büyük damar aterosklerozuna benzer.

3. Küçük damar oklüzyonu (lakün)

Tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturan laküner enfarkt, perforan dallarda meydana gelen oklüzyonlar sonucunda ortaya çıkan klinik tablodur. Klasik laküner enfarktlar başlıca motor, duyu, sensoriomotor, ataksik hemiparezi şeklinde bulgu verirler. Diyabet ve hipertansiyon öyküsü olan hastalarda daha sık görülmektedir. CT / MRG'de herhangi bir patoloji görülmeyebilir veya 1.5 cm'den küçük enfarktlar görülebilir.

4. Diğer belirlenen nedenler

Bakteriyel endokardit, serebral vaskülit, karotis ve vertebral arter diseksiyonu, serebral amyloid anjiyopati, travma, konjenital damar hastalıkları, mitokondrial hastalıklar... belirlenen diğer nedenler arasındadır.

5. Belirlenemeyen nedenler

Detaylı incelemeler sonucu herhangi bir etken bulunamayan enfarkt grubudur. Birden fazla nedene bağlı enfarktlar da bu gruba girer.

2.1.3. Risk faktörleri

İnmenin risk faktörleri yaş, cinsiyet, özgeçmiş, alışkanlıklar gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olarak 2 grupta incelenebilir:

Değiştirilemez risk faktörleri

- Yaş: İnme riski yaşla artmakla beraber 55 yaşından sonra risk her 10 yılda bir 2 katına çıkmaktadır (1,20).
- Cinsiyet: Kadınlarda yaşam boyu inme görülme sıklığı erkeklere göre daha az olmasına rağmen ileri yaş popülasyonunda kadınlar daha fazla olduğundan kadınlarda inme mortalitesi daha fazladır (6).
- Etnik köken: Farklı etnik kökene sahip insanlar arasında inme insidansı farklılık göstermektedir. Sacco ve ark. 2001 yılında yaptıkları Kuzey Manhattan İnme çalışmasında inme risk faktörlerinde etnik köken etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada hipertansiyon tüm ırklarda inme için risk faktörü olmasına rağmen afro amerikalılarda ve hispaniklerde daha yüksek prevalansa sahiptir. Kuzey Manhattan İnme çalışması ayrıca koroner arter hastalığının inmede beyaz ırkı siyah ırka göre daha fazla etkilediğini vurgulamaktadır (7,8). Bravata ve ark. yaptığı çalışmada ise inme risk

faktörlerinden hipertansiyon, diyabet, CRP yüksekliği, kladükasyo ve aktivite kısıtlılığı siyahi popülasyonda yüksek iken ileri yaş, miyokardiyal enfarktüs (MI), düşük HDL ise beyaz popülasyonda daha sık görüldüğü belirtilmiştir (7,9). Ayrıca inme sonrası fonksiyon kaybı da ırklar arasında farklılık göstermektedir. Fiziksel fonksiyon kaybı siyah toplumlarda daha fazla olduğu belirtilmiştir (10). İnme insidansı yanı sıra inme alt grupları da etnik köken açısından araştırılmıştır. Meksikalı amerikalılarla hispanik olmayan beyazlar arasında yapılan bir çalışmada ise bu iki etnik grup arasında geçici iskemik atak, intraserebral hemoraji, subaraknoid kanama insidansı meksikalı amerikalılarda daha yüksek olduğu belirtilmiştir (11).

- Genetik: Hem değiştirilebilir hem de değiştirilemeyen risk faktörlerini etkileyebilir. Ailede inme öyküsü olması kişinin inme riskini artırır. Aynı zamanda tek gen mutasyonları da inmeye neden olabilecek patofizyolojiyi etkileyebilir. Genetik nedeniyle ortaya çıkan hastalıkların (orak hücreli anemi) yan etkileri inmeye neden olabilir. Ayrıca bazı genetik polimorfizmler (9p21) de inme için risk faktörü olabilirler (12).
- Geçici iskemik atak (TİA) : Akut enfarkt olmadan meydana gelen geçici nörolojik fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır. TİA, inme için uyarıcı olabilir. Bu nedenle gerekli önlemler ve tedavi başlanmalıdır.

Değiştirilebilen risk faktörleri

- Hipertansiyon (HT): HT en önde gelen risk faktörlerindedir. İskemik inmede hastalarda geçici bir hipertansiyon atağı görülebilir. Bu hipertansiyon atağı hasarlı ve savunmasız serebral hücrelere zarar verebilir. Ancak inmede ideal kan basıncı hala tartışmalıdır. Uzun dönemde kan basıncı kontrolü inme riski açısından faydalı olmakla beraber akut enfarkt sonrası kan basıncını düşürme kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (13). Yüksek kan basıncı ödemi artırdığı ve bunun da kötü sonlanımla seyrettiğini savunanlara karşı düşük kan basıncı inmede kurtarılabilir alan olan penumbranın kanlanması için gerekli olan kanın sağlanamadığı savunulur (14). 40-69 yaş aralığında

sistoldeki 20 mmhg diyastolde 10 mmhg değişiklik mortalite oranını 2 kat artırır (15). Başka bir çalışmada ise 5-6 mmhg'lik değişiklik inme riskini %42 azalttığı gösterilmiştir (16).

- **Diyabet:** Diyabet, vasküler endotelyal disfonksiyon, kapiller bazal membran kalınlaşması, iflamasyon, NO'in vasküler aktivitesinin bozulması gibi etkilerle vasküler hasara neden olup inme riskini artırır. İnme, diyabetli genç popülasyonlarda daha sık görülür. Greater Cincinnati / Northern Kentucky inme çalışma grubu afro amerikalılarda 55 yaş öncesinin ve beyaz popülasyonda ise 65 yaş öncesinin daha riskli olduğunu bildirmişlerdir. Tip 2 diyabetiklerde normal popülasyona göre damar duvarları daha sert ve daha düşük elastikiyete sahiptirler. Tip 1 diyabette özellikle karotiste intima ve media tabakası kalınlaşır. Bu da atreoskleroz başlangıcı olarak kabul edilir. Diyabetiklerdeki CRP artışı da ateroskleroza katkıda bulunur (17). Diyabet, inme riskini 2-6 kat, mortalite oranını ise %20 artırmaktadır (1). İnmeyle başvuran hastaların %30-40'ında hiperglisemi görülür (18). Sadece diyabet tanılı hastalar için değil bozulmuş glukoz toleransı olan hastalar da inme için risk altındadır. Başlangıçtaki glukoz oranı inme sonrası morbiditeyle ilişkilidir. Yüksek glukoz oranı serebral dokuda laktat oranını artırır. Laktat ise kurtarılabilecek doku olan penumbranın beslenmesini bozarak iskeminin yaygınlaşmasına katkıda bulunur. Hiperglisemi iskemi sonrası kötü sonlanımla ilişkili olduğundan Amerikan Kalp Derneği (AHA) / Amerikan İnme Derneği kılavuzları serum glukozunu 140-180 mg/dL seviyesine indirmeyi önermektedir. İskemik inme geçiren hastaların ilk 48 saatte glukoz oranları kontrol altına alınmasının morbiditeyi etkilediği gösterilmiştir.
- **Atriyal Fibrilasyon:** Atriyal fibrilasyon, inme için önemli bir risk faktörü olup yaşa bağımlı riski 2-5 kat artırır. İnmelerin %24.6'sında atriyal fibrilasyon görülür. Atriyal fibrilasyon ile birlikte görülen inmeler genellikle kardioemboliktir. Bunlar sıklıkla geniş yaygın enfarktlara neden olurlar. Atriyal fibrilasyon, genellikle anterior sirkülasyon enfarktlarıyla ilişkilidir. Araştırmalar atriyal fibrilasyonda sol atriumda biriken kanın inmeye neden olabilecek embolilere neden olduğu göstermesine karşın son çalışmalar

inmeden sonra atriyal fibrilasyonun kaydedildiğini göstermiş olup bu bilgilerle çelişmektedir(1,19).

- Dislipidemi: LDL kolesterolünü düşürmek büyük arterlerdeki aterosklerozu önlemede başarılı iken küçük damarlardaki aterosklerozu ve kardioembolik inmeyi önleyememektedir. Trigliserid oranını düşürmek de inmeye karşı koruyucu olmayabilir. HDL yüksekliği ise küçük damarlardaki aterosklerozu önleyebilir ancak büyük arterlerdeki ateroskleroz ve kardioembolik inmeye karşı koruyucu değildir (21).
- Alkol: Alkol ile inme arasındaki ilişki tüketilen alkol miktarına göre değişkenlik gösterir. Az ve orta alkol tüketimi (haftada 150-300 mg) inmeye karşı koruyucu olabilirken aşırı alkol tüketimi (haftada 300 mg'dan fazla) inme için risk faktörüdür (22). Son 24 saatte 40 mg'dan fazla alkol tüketenlerde de inme riski arttığını gösteren araştırmalar mevcuttur (23).
- Sigara: Sigara ile inme arasında doğrudan ilişki söz konusudur. İnme riski, sigara içenlerde içmeyenlere oranla 1.6 kat daha fazladır (24). Sigara kandaki karbonmonoksit (CO) miktarını artırır. Artan CO miktarı endotel hasarına neden olur. Bununla birlikte sigara kandaki fibrinojen miktarını, trombosit fonksiyonlarını da etkiler. Tüm bunlar bir araya geldiğinde sigara içenlerde koagülasyona yatkınlık artar. Sigara içmeyi bırakanlarda ortalama 5 yıl içinde inme riski içmeyenlerle aynı seviyeye gelmektedir.
- Fiziksel aktivite yetersizliği: Artmış inme riskiyle ilişkilidir. Fiziksel aktiviteyle beraber beslenme alışkanlığındaki değişiklikler inme riskini azaltır.

Ayrıca hiperhomosisteinemi, oral kontraseptif kullanımı, hormon replasman tedavisi inme için risk faktörlerindedir.

2.1.4. Radyolojik bulgular

Kontrastsız BT: Bilgisayarlı tomografi (BT) ulaşılabilir olması, çekimin kısa sürmesi ve bu sayede tanı ve tedavide zaman kaybını önlemesi açısından çok önemli bir role sahiptir. İnmenin en önemli basamağı hemorajik mi yoksa iskemik mi olduğudur. Beyin BT sayesinde tanı konulur ve tedaviye başlanır. Kontrastsız beyin

BT ayrıca erken iskemik inme bulgularını gösterebilir. Bunların spesivitesi yüksek sensivitesi düşüktür. Bu erken bulgular: gri cevher beyaz cevher farkı kaybolması(özellikle insulada ve lentiform çekirdeklerde), damardaki trombüs içeriğinden dolayı hiperdens damar bulgusu, ödemden dolayı sulkusların silinmesidir (25).

BT Angio: BT angio enfarktı değerlendirmede oldukça önemlidir. Enfarkt alanını göstermesi yanısıra disseksiyonu, anevrizmayı, kollateral dolaşımı gösterebilir. Karotis stenozuda sensivitesi (%80-%90) spesivitesi (%90-%91) iken serebral enfarktlarda sevsivite (%92-%100) spesivite (%82-%100) dür. Ayrıca yüksek yoğunluklu projeksiyonlar (mdp) trombüsün büyüklüğü ve leptomeningeal kollaterallerin durumu hakkında bilgi verir. Trombüs büyüklüğü iv tPA tedavisi için oldukça önemlidir. Geniş ve büyük damarlardaki trombüs ile trombüs kalınlığı 8 mm den büyüklerde tek başına iv tPA'nın etkinliği düşüktür. Bu hastalar daha çok intraarteriyel trombektomiden fayda görürler (26,27). İyi leptomeningeal kollaterallere sahip hastalarda iskemik enfarkt çekirdeği daha küçük olup kurtarılabilir dokunun kurtarılması yüksek ihtimalken kollateralleri zayıf olanlarda dokunun kurtarılması daha düşük ihtimaldir.

MRG: Standart MRG sekansları (T1, T2, FLAIR) iskemik inmenin erken saatlerinde enfarkt alanını gösteremeyebilir. DWI ise yüksek sensivite (88%–100%) ve yüksek spesiviteye (%95-%100) sahiptir. DWI iskemiye dakikalar içinde bile gösterebilir. İskemi, serebral dokuda serbest su moleküllerinin dolaşımını kısıtlar bu da DWI sekansında yükek yoğunluklu görüntü olarak tespit edilir. DWI temelde T2 sekanstır. Bu nedenle T2'de hiperdens görülen alanlar DWI de hiperdens görülür. DWI deki bu hiperdens alanların gerçekten diffüzyon kısıtlılığına mı bağlı yoksa T2'deki hiperdens mi olduğu her zaman anlaşılammaktadır. Bunu gidermek için ise apparent diffusion coefficient (ADC) haritası kullanılmaktadır. Bir görüntüleme T2 hiperdens, DWI hiperdens, ADC de hipodens ise bu gerçek enfarktır. T2 hipodens, DWI hiperdens, ADC hiperdens ise bu enfarkt değil T2'nin parlama etkisidir (28). Enfarkt çekirdeğinin büyüklüğü orta serebral arter (MCA) enfarktlarında prognozla yakından ilişkilidir. Bu alan DWI'de hesaplanabilir. $2 \left(\frac{\text{en boy} \times \text{yükseklik}}{2} \right)$. Bu alan 70 ml'den daha küçükse serebral perfüzyon sonrası iyi prognozla ilişkiyken 100 ml'den büyükse rekanalizasyondan sonra kanama ihtimali yüksek olup kötü

prognozla ilişkilidir (29,30). 70-100 ml arasındakilerin ise belirsizdir. Ancak posterior sirkülasyondaki enfarktlarda bu hesaplama geçerli değildir. Beyin sapındaki küçük bir enfarkt alanı çok ciddi sonuçlara yol açabilir.

MRG Angio: İlk başvuru olan tetkiklerden olan BT angio çekilemediği durumlarda (kontrast maddeye karşı hassasiyet, böbrek fonksiyon bozukluğu gibi)kullanılabilir.

2.1.5. Komplikasyonlar

- Kardiyak komplikasyonlar: İskemik inmeyle iskemik kalp hastalıklarının bazı risk faktörleri ortaktır. Aslında iskemik inme genelde yaşlılarda görüldüğü için ve bunlarda da kardiyak patolojiler sık görüldüğünden patofiziyojiyi ayırt etmek zordur (31).Konjesif kalp yetmezliği, kapak hastalıkları, atriyal fibrilasyon iskemik inme riskini artırırken; iskemik inme de otonom kontrolü bozarak kardiyak komplikasyonlara neden olur. Bozulan otonomik kontrol ve fiziyojik stresle beraber iskemik inmede MI ile ilişkili testlerde yükselme görülebilir (32,33). İskemik inmede nöral sistem tarafından indüklenen myokardiyal hasar meydana gelir (myositolozis). Araştırmalar sağ insulada görülen enfarktlarda myokardiyal iskemiye özgü enzim artışı olduğu gösterilmiştir. İskemik inmelerde troponin yüksekliği mortalite ve morbiditeyle ilişkilidir (34).

İskemik inme sonrası görülen diğer kardiyak komplikasyon ise aritmilerdir. Bu aritmiler; atriyal fibrilasyon, supraventriküler taşikadi, ventriküler taşikardi, ventriküler extra sistollerdir. Limbik sistem ve diğer otonom sistemlerle sıkı bağlantıları olan insulada meydana gelen enfarktlar anormal kardiyak repolarizasyona neden olur. Özellikle sağ insuladaki enfarktlar, QT uzunluğu ve sol dal bloğu birlikteliği kötü prognozla ilişkilidir (35).

İskemik inmede mortalitenin önemli nedenlerinden birisi de konjesif kalp yetmezliğidir. MI, aritmi, HT, preload yük artışı konjesif kalp yetmezliğine katkıda bulunur. İskemik inmede klasik olarak sol ventrikül apikal balonlaşma, geçici ST yüksekliği, T negatifliği görülür. MI'dan farklı olarak iskemik inmede BNP artar.

- Pulmoner komplikasyonlar: Pnömoni iskemik enfarkt sonrası en sık görülen komplikasyonlarından biridir. Enfarkt sonrası ilk 48 saatte görülen ateşin en sık nedeni pnömonidir. Pnömoni, inme sonrası komplikasyonlar arasında en yüksek mortaliteye sahip komplikasyon olup mortalite oranını 3 kat artırmaktadır(36). İnme sonrası pnömoninin en sık nedeni aspirasyonken, risk faktörleri ise 65 yaş üstü olmak, konuşma bozukluğu, inme sonrası morbidite varlığı, kognitif fonksiyon bozukluğu sayılabilir(37). Beyin sapı gibi hayati bölgelerdeki enfarktlar sonucu mekanik ventilasyon bağımlılığı da pnömoni sıklığını artırır.

Enfarkt sonrası görülen bir diğer pulmoner komplikasyon da desatürasyon ve apnedir. Enfarkt sonrası ilk 48 saatte hastaların üçte ikisinde oksijen saturasyon düşüklüğü görülmektedir. Bu saturasyon düşüklüğü penumbranın beslenmesi için gerekli olan kandaki oksijenizasyonu olumsuz yönde etkilemektedir. Enfarkt sonrası beyindeki solunum düzenleyici sistemler hasara uğrayarak uyku apnesine veya solunum kas güçsüzlüğüne neden olarak hipoksiye neden olur. Buna ek olarak pnömoni, aspirasyon gibi faktörler de satürasyon düşüklüğüne neden olurlar.

- Gastrointestinal komplikasyonlar: İskemik enfarkt sonrası disfaji %37 ile %78 sıklığında görülür (38). Disfaji ayrıca iskemi sonrası aspirasyon pnömonisinin de en büyük risk faktörüdür. Yutma merkezi beyin sapının alt yarısında yer almasına rağmen disfaji genellikle tek taraflı hemisferik iskemik inmelerde görülür. Bu hastaların beslenmesi nazogastrik sondayla veya perkütan endoskopik gastrotomi (peg) ile yapılır. İskemik inme sonrası gastrointestinal kanama %1,5 olarak gösterilmiştir (39). Ayrıca FOOD denemesine göre nazogastrik sonda ile beslenen haslar peg ile beslenenlere göre daha fazla kanama riski altındadırlar. H2 reseptör antagonisti, antiasid, sukralfat kullanımı gastrointestinal sistem (GİS) kanamalarına karşı koruyucudur. Ancak H2 antagonist pnömoni riskini artırmaktadır. Diğer bir GİS komplikasyonu fekal inkontinanstır. Akut iskemi sonrası fekal inkontinans %30-%56 arasındadır. İleri yaş, bilinç değişiklikleri, geniş enfarkt alanı fekal inkontinans için predispozan faktörlerdir. Antikolinergik ilaçların kullanımı ise fekal inkontinans riskini artırır (40).

- Genitoüriner komplikasyonlar: Enfarkt sonrası idrar yolları enfeksiyonu (İYE) sıklıkla görülen komplikasyonlar arasındadır. İleri yaş, kadın cinsiyet, enfarktın büyüklüğü, kateter kullanımı İYE için predispozan faktörlerdir. Antimikrobiyal kateter kullanımı ve idrar kültürlerine uygun antibiyotik başlanması bu riski azaltır.

Enfarkt sonrası idrar inkontinansı da görülebilir. Bunu Gelber ve ark. yaptıkları çalışmada kortikospinal yolun etkilendiğini bu da destrüktör kasların tonusunu arttırdığını ve sonuç olarak enfarkt sonrası idrar inkontinansı görülebildiğini belirtmiştir(41).

- Venöz tromboemboli: Enfarkt sonrası alt ekstremitte paralizisi olan hastalarda sıklıkla derin venöz tromboz (DVT) görülür. Enfarkt sonrası ilk 1 hafta içinde görülme sıklığı yüksektir(42). İleri yaş, dehidratasyon, enfarktın büyüklüğü emboli riskini artıran faktörlerdir. DVT, asemptomatik olabileceği gibi alt ekstremitelerde ödem, ağrı, hassasiyet, ateş, pulmoner emboliyle klinik bulgu verebilir.

Enfarkt sonrası erken ölümün en önemli nedenlerinden biri pulmoner embolidir. Pulmoner emboli, enfarkt sonrası 2 ile 4. hafta aralarında sıklığı artar. Düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) ve düşük doz unfraksiyonel heparin / standart heparin (SH) profilaksisi DVT ve pulmoner emboliye karşı koruyucu olmaktayken kanama riskini artırır. Yüksek doz SH (günlük 15000 iu) pulmoner emboliye karşı koruyucu iken intrakranial kanama riskini artırır. Düşük doz SH (günlük 15000 iu altı) DVT için koruyucu iken pulmoner emboli ve intrakranial kanama üzerine etkisi yoktur.

Yüksek doz DMAH (>6000 iu günlük) DVT ve pulmoner emboli için koruyucu iken intrakranial kanama riskini artırır. Düşük doz DMAH (<6000 iu günlük) DVT ve pulmoner emboliye karşı korucuyu iken intrakranial kanama riskini artırmaz(43).

- Kas iskelet sistemi komplikasyonları: Osteopenik kemik yapısına sahip yaşlılarda yüksek mortalite ve morbiteye sahip kalça fraktürleri, iskemik inmede görülebilen komplikasyonlardandır. İskemik inmenin ilk bir yılında normal popülasyona göre kalça kırığı görülme sıklığı 7 kat fazladır. Antikoagulan kullanımı kemik kaybını artırır. Fraktürler genellikle paretik

tarafında görülür. Enfarkt sonrası ortaya çıkabilen denge kaybı, nöbet, neglect sendromu, motor fonksiyon bozukluğu gibi nedenlere bağlı düşme atakları görülebilir. Bunlara bağlı da kalça kırıkları en sık görülen kırık tipidir.

İskemik enfarktan sonra ilk birkaç ay içerisinde değişik derecelerde ağrı ortaya çıkar. Ağrı en sık ekstremitelerde özellikle omuzlarda, baş ağrısı ve vücudun diğer bölgelerinde görülür. Enfarkt sonrası ağrının birçok nedeni vardır. Özellikle yaşlılarda eşlik eden ek patolojiler (artrit, pozisyon bozukluğu, immobilizasyon) enfarkt sonrası ağrıya katkıda bulunur. Bunun yanısıra enfarkt sonrası spinotalamik yolda meydana gelen hasar da ağrının nedenleri arasındadır.

- Yorgunluk: Yorgunluk enfarkt sonrası görülebilen komplikasyonlardandır. Anemi, enfeksiyon, hipotiroidi, adrenal yetmezlik ve depresyon da yorgunluğa katkıda bulunabilir.
- Depresyon: Enfarkt sonrası depresyon derecesiyle ilgili veriler net değilken minör semptomlar birçok hastada görülür(44). Kadınlarda, gençlerde, büyük engeli olanlarda daha fazla görülür.
- Ateş: İskemik enfarkt sonrası ilk 72 saatte %60 oranında görülür(45). Yaygın enfarktlarda ateş daha sık görülür.
- Dekübit yaraları: Uzun süre yataklık kalan hastalarda görülür. Erken mobilizasyon, 2 saatte bir pozisyon değişikliği, havalı yataklık, topuklara yastıklar dekübit yaralarını önlemede alınabilecek tedbirlerdir.

2.1.6. İskemik inmenin tedavisi

Akut iskemik inmede iki uygun tedavi tablosu mevcuttur; bunlar intravenöz trombolizis ve mekanik trombektomidir. İlk 4.5 saat içinde acile başvuran hastalarda Beyin Tomografi ve Beyin Tomografi Anjio boyundan itibaren çekilmelidir. Serum kreatinin düzeyi beklenip BT anjio geciktirmemelidir. BT Anjio zaman kaybetmemek için BT ile çekilmelidir. Akut iskemide 6 ile 24 saat içinde başvuran hastalarda mekanik trombektomi için BT ve MR beraber çekilebilir.

- İntravenöz Trombolizis

AHA/ASA tarafından önerilen intravenöz tPA infüzyonu semptomların başladığı ilk 3 saat içinde başvuran hastalara uygulanabilir. Bu tedavi şeması ilk 4.5 saat içinde başvuran uygun hastalara genişletilebilir. İntravenöz tPA tedavisi için hastanın nörolojik semptomunun olması, ilk 3-4,5 saat içinde başvurması ve 18 yaşından büyük olması gerekmektedir. Hasta son 3 ay içinde kafa travması geçirmişse, subaraknoid kanama semptomları mevcutsa, intrakraniyal kitlesi mevcutsa, arteriovenöz malformasyon ya da anevrizması varsa, geçirilmiş intrakraniyal ya da intraspinal cerrahi öyküsü varsa, sistolik tansiyonu 185 mmHg'dan diyastolik tansiyonu 110 mmHg'dan yüksekse, aktif iç kanaması mevcutsa, trombosit milimetre küpte 100.000'den küçükse, hasta son 48 saatte heparin almışsa ve aPTT üst sınırından daha da yüksekse, hastanın antikoagülan kullanımı ile beraber INR'si 1.7'den yüksekse ya da PT'si 15 saniyeden yüksekse veya kan şekeri 50 mg/dL'den küçükse intravenöz tPA verilmez.

- Endovasküler tedavi

İntravenöz tedavisi etkili bir tedavi olmasına rağmen kullanımını sınırlayan kriterlere sahiptir. Dahası, intravenöz tPA ilk 4,5 saatlik zaman diliminden sonra kullanılmaz ve büyük damar tıkanıklığı olan hastalarda sınırlı etkinliğe sahiptir (46). Fransa Nörovasküler Topluluğu internal karotid arter, orta serebral arter tıkanıklığı gibi proksimal tıkanıklıklarda mekanik trombektomi, intravenöz trombektomi ile beraber tamamlayıcı bir tedavi olarak önerir. İntravenöz trombektomi kontraendikasyonu olan hastalarda büyük damar tıkanıklığı varsa mekanik trombektomi önerilmeli (47).

2.2. Serebral Kan akımı ve Otoregülasyon

2.2.1. Beynin Ana Arterleri

Beyin vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen kan akımının %20'sini oksijenin ise %25'ini almaktadır. Bu yüksek perfüzyondan dolayı beyin 2 adet karotid arter ve 2 adet vertebral arter tarafından oluşturulan yüksek kan akımına

sahiptir. Karotid arterler anterior sirkülasyonu oluştururken vertebral arterler ise posterior sirkülasyonu oluşturmaktadırlar. Serebral arterler kortikal ve perforan arterler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Perforan arterler Willis poligonundan veya dallarından ayrılıp direkt olarak parankime girerler. İnternal karotid arter, anterior koroidal arter, anterior kommunikan arter, anterior serebral arter, orta serebral arter, posterior kommunikan arter, posterior serebral arter perforan dallar verirler.

A- Anterior Sirkülasyon

1-İnternal Karotid Arter (İKA)

Bouthiller ve ark. İKA'ı 7 segmentte incelemişlerdir. Bu segmentler; C1 (servikal), C2 (petröz), C3 (laserum), C4 (kavernöz), C5 (klinoid), C6 (oftalmik) ve C7 (kommunikan) segmentlerdir (48). **C1(servikal) segment**; karotis kommunisten başlayıp karotid foramene kadar olan segmenttir. Bu segment herhangi bir dal vermez. **C2(petröz) segment**; karotid foramenden başlayıp foramen laseruma kadar olan segmenttir. **C3(laceral) segment**; foramen laserumdan başlayıp petrolingual ligamente kadar olan segmenttir. Karotikotimpanik arter ve pterigoid (vidian) arter dallarını verir. **C4(kavernöz) segment**; İKA petrolingual ligamanı geçtikten sonra durayı deler ve kavernöz segment başlar, proksimal dural ringe kadar olan segmenttir. Ana dalları;

- Meningohipofizyal trunk
- Anterior meningeal arter
- Mc Connel'in kapsüler arteri
- İnterior kavernöz sinüs arteri
- Persistan Primitif Trigeminal Arter (PPTA)

C5(klinoid) segment; proksimal dural ring ile distal dural ring arasındaki segmenttir.

C6(oftalmik) segment; distal dural ringe posterior kommunikan artere kadar olan segmenttir. Bu segmentten çıkan arterler;

- Oftalmik arter: subaraknoid mesafedeki en uzun dal olup optik sinirin altından optik kanala girer. Buradan çıkan dallar optik siniri, kiazmayı, pituiter stalkı besler.
- Süperior hipofizyal arter: ön hipofizi ve pituiter stalkı besler.

C7(kommunikan) segment: PKomA'den İKA bifurkasyonuna kadar olan segmenttir. Bu segmentten çıkan arterler:

- Posterior kommunikan arter: anterior ve posterior sirkülasyonu birbirine bağlar. Optik siniri, inferior kiazmayı, posterior hipotalamusu, anterior ve ventral talamusu, internal kapsülün posteriorunu besleyen perforanlar çıkar.
- Anterior koroidal arter: internal kapsülün arka bacağına 2/3 lük arka kısmını, unku, optik radyasyo liflerini, globus pallidusun medialini, internal kapsülün genusunu besler. Pleksal ve sisternal segment olmak üzere iki segmente ayrılır.

2- Anterior Serebral Arter

İKA'nın iki terminal dalından biri olan anterior serebral arter anterior kommunikan artere göre prekommunikan ve postkommunikan olmak üzere ikiye ayrılır. Postkommunikan bölüm ise 4 segmente ayrılır.

- **prekommunikan segment (A1):** İKA bifurkasyonundan anterior kommunikan artere kadar olan segmenttir. Bu segmentten çıkan perforanlar talamus, hipotalamus, internal kapsül, kiazma, bazal ganglionlara gider.
- **infrakallosal segment(A2):** Anterior kommunikan arterden korpus kallosumun genu ve rostrumun birleştiği yere kadar olan segmenttir. 3 dalı vardır. Bunlar; orbitofrontal arter, frontopolar arter ve Heubner'in rekürrent arteridir.

Hebuner'in rekürrent arteri, 1872 yılında Johann Otto Leonhard Heubner tarafından tanımlanan bu arter A1, A2 veya A1-2 bileşkesinden köken alır. Kaudat çekirdeği, globus pallidusun medialini, internal kapsülün anterior bacağına, anterior hipotalamus gibi alanları besler. Tıkanıklığında hemiparezi, afazi, koreatetoz, dizartri, abulia ortaya çıkabilir(49).

- **prekallosal (A3):** Perikallosal ve kallosomarjinal dallardan sonra başlayıp arterin korpus kallosumda horizontal düzleme geçtiği yere kadar olan segmenttir. Kortikal dalları; anterior internal frontal arter (AIFA), orta internal frontal arter (MIFA), posterior internal frontal arter (PIFA) ve kallosomarjinal arterdir. Bunlar superior frontal gyrusun medial ve lateral yüzeylerini, parasantral gyrusun posteriorunu beslerler.
- **suprakallosal segment(A4):** korpus kallosumun üzerinde koronal sütünun anteriorunda kalan segmenttir.
- **posterokallosal segment(A5):** korpus kallosumun üzerinde koronal sütünun posteriorunda kalan segmenttir.

A4 ve A5 segmenleri ise superior frontal gyrusun posteriorunu, singulat gyrusu, motor, duyu ve premotor alanları, kuneus ve prekuneusu beslerler(50).

Sağ ve sol anterior serebral arterler anterior kommunikan arter (AKomA) aracılığıyla bağlanırlar. AKomA'den çıkan perforan arterler infundibulumu, kiazmayı, hipotalamusun preoptik bölgesini ve subkallosal bölgeyi besler. Bu dalların tıkanıklığında elektrolit bozukluğu, bilinç değişikliği gibi klinik bulgular ortaya çıkar.

3- Orta Serebral Arter

İKA'nın 2 terminal dalından büyük olanıdır. 4 segmentte incelenir. Bu segmentler; **M1 segment** (sfenoid veya horizontal segment), **M2 segment** (insular segment), **M3 segment** (operkular segment) ve **M4 segmenttir**(kortikal dallar). Orta serebral arterin kortikal dalları ise şunlardır; orbitofrontal arter (OfA), prefrontal arter (PfA), presantral arter (PcA), santral arter (CA), anterior ve posterior paryetal arterler, angular arter (AA), temporal arterler (temporopolar, anterior, orta ve posterior temporal arterler) ve temporo-okspital arterlerdir (ToA)(51,52).Bu kortikal dalların tıkanması motor güçsüzlüğe, emme yakalama refleks kaybına, motor afaziye, metal değişikliklere, neglect sendromuna, görme defektlerine neden olmaktadır.

B- Posterior Sirkülasyon

Beynin posterior sirkülasyonunu vertebrobaziller sistem sağlamaktadır. Beyin kan akımının yaklaşık %20'sini karşılamaktadır. Sağ ve sol vertebral arterlerin birleşmesiyle oluşan baziller arter terminalde willis poligonuna katılan posterior serebral arter dalını veririr.

1- Posterior Serebral Arter (PSA)

Baziller tepeden dallanan PSA, PKomA aracılığıyla anterior sirkülasyona bağlanır. 4 segmente ayrılmıştır :

- **P1 segment (pedinküller)** : Baziller tepeden PKomA'e kadar olan bu segment interpedinküller sisternde yer almaktadır.
- **P2 segment (ambient)**: PKomA'den başlayıp kuadrigeminal sisternde orta beynin lateral kenarının posterioruna kadar olan segmenttir. Krural sistern içindeki segment P2A(anterior), ambient sistern içindeki segment ise P2P(posterior) olarak adlandırılır.
- **P3 segment (kuadrigeminal)** : Kuadrigeminal sistern içinden geçen orta beynin lateral yüzeyinin posteriorundan başlayıp paryetooksipital sulkusa kadar olan segmenttir.
- **P4 segment (kortikal)** : Paryetooksipital sulkustan başlayan kortikal dallardır. PSA'in 3 ana dalı vardır: santral perforan dallar, ventriküler ve koroid pleksus dalları ve serebral korteksi ve korpus kallosumun spleniumunu besleyen dallardır.

- ✓ Santral perforan dallar: Talamoperforanlar, talamogenikulat arterler, pedinküler perforan arterler, sirkumflex arterlerdir.
- ✓ Ventriküler ve koroid pleksus arterleri: Medial posterior koroidal arter %70 P2A'dan çıkar. Lateral posterior koroidal arter ise %87 oranında P2P'den köken alır.
- ✓ Serebral korteksi ve korpus kallosumun spleniumunu besleyen dallar: İnférieur temporal arter (P2A / P2P den köken alır), ilk kortikal dal olan posterior hippokampal arter (%60 P2A),

paryetooksipital arter (%70 P3), kalkarin arter (%60 P3), splenial arter (posterior perikallosal arter) ise parteyooksipital arterden köken alır (53).

2.2.2. Otoregülasyon

Beyin, vücut ağırlığının %2'sini oluşturmasına rağmen tüm oksijenin yaklaşık %20'sini tüketmektedir. Beyne gelen kan miktarı ortalama 50 ml/100gr/dk olup nörolojik bozukluklar 20 ml/100gr/dk nin altında başlar. 10 ml/100gr/dk'nın altında ise irreversibl döneme girilir. Oksijenin serebral metabolizma oranı (CMRO2) erişkinlerde yaklaşık 3.4 ml/100gr/dk'dır. Nörolojik sekel olmadan 3.9-1.8 ml/100gr/dk arasında değişebilir(54).

Beynin temel enerji kaynağı glukozdur. Beyin, enerjisinin yaklaşık %90'ını glukozdan sağlamaktadır. 100 gr beyin dokusu dakikada 5.5 mg glukoz tüketmektedir. Bu total vücut glukoz tüketiminin %25'ine denk gelmektedir. Glukoz piruvata yıkılır, yeterli oksijen varlığında piruvattan Asetil CoA oluşur. Asetil CoA, kreps siklusuna girer ve H⁺ iyonlarını oluşturur. NAD ve elektron transport sistemleri H⁺ iyonlarını yakalayan temel sistemler olup sonuç olarak 1 mol glukozdan yeterli oksijen varlığında 38 mol ATP oluşur. Oksijen yetersiz olması durumunda bu glikoliz olayı durur ve piruvattan laktat oluşur. Laktattan anaerobik glikolizle 1 mol glukozdan 2 mol ATP üretilir. Hipokside enerji ihtiyacı arttığı için daha fazla glukoz ihtiyacı doğmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak hipokside glukoz tüketimi artmaktadır. Anaerobik glikoliz sonucu nöronlarda toksik etkili olan laktik asit üretimi artar. Bu nedenle yeterli serebral kan akımı serebral fonksiyonların korunması için çok önemlidir. Serebral kan akımı serebral otoregülasyon mekanizmalarıyla dengede tutulmaya çalışılmaktadır.

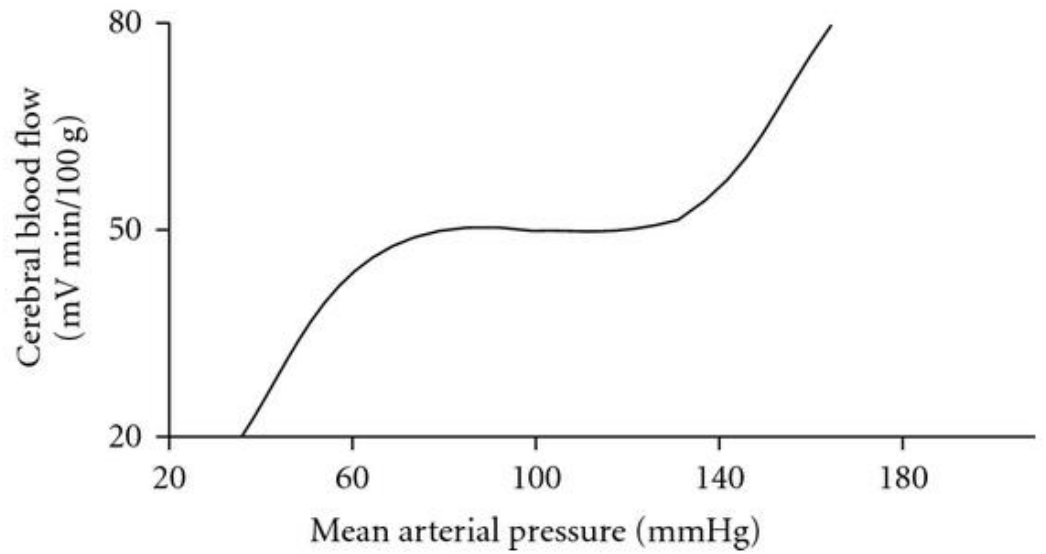
Serebral kan akımı ve otoregülasyon oldukça karmaşık olan mekanizmalarla düzenlenmektedir. Bu alanda son yıllarda yapılan çalışmalarla büyük ilerleme

kaydedilmiştir. Ancak mikrosirkülasyon düzeyinde araştırmalar hala devam etmektedir (55).

Serebral kan akımında 3 temel mekanizma rol almaktadır. Bunlar; otoregülayon mekanizmaları, kan akımı-serebral metabolizma ilişkisi ve nörojenik kontroldür. Bu mekanizmalarda rol alan temel hücreler ise endotel ve astrositlerdir.

a) Ototregülayon Mekanizmaları

Değişen serebral perfüzyon basıncına karşı serebral kan akımının kontrol edilebildiği süreç serebral otoregülayon sürecidir. 50-150 mmHg'lik serebral perfüzyon basınçlarında serebral kan akımı sabittir. Bu serebral otoregülayonun korunduğu basınç aralığı olarak değerlendirilebilir. Bu değerler dışındaki perfüzyon basıncında serebral kan akımında ciddi değişiklikler görülür (şekil 2).



şekil 2. Ototregülayonun düzenlenmesi (55)

Bu otoregülayon mekanizması endotel, perivasküler sinirler ve vasküler düz kaslarla ilişkilendirilsede mekanizma hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Kan akış

hızının vazokonstrüksiyonu indüklediği gösterilmiştir. Bu fiziolojinin temelini ise endotel oluşturmaktadır. Endotel birçok vazomodülatörün kaynağı olup mekanoreseptörlere sahiptir. Yapılan çalışmalarda endoteli çıkarılan damarlarda kan akış hızının vazokonstrüksiyon yanıtının zayıf olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise Harder vasküler kaslardaki depolarizasyonun vazokonstrüksiyonda rol aldığını göstermiştir(56).

b) Kan akışı - serebral metabolizma ilişkisi

Uzun yıllardan beri serebral kan akımı ile serebral metabolizma arasında sıkı bir ilişki olduğu bilinmektedir. Araştırmalarda serebral kan akımı ile serebral metabolizma arasında görev alan moleküller üzerinde durulmuştur. Bu moleküllerden potasyum ve hidrojen iyonlarının vazodilatasyonu indükledikleri böylece kan akışı ile serebral metabolizma arasında ilişki sağladıkları gösterilmiştir. Vasküler düz kaslarda potasyum kanallarının bulunması nöral aktiviteyle kan akımı arasında ilişki olduğunu gösterir.

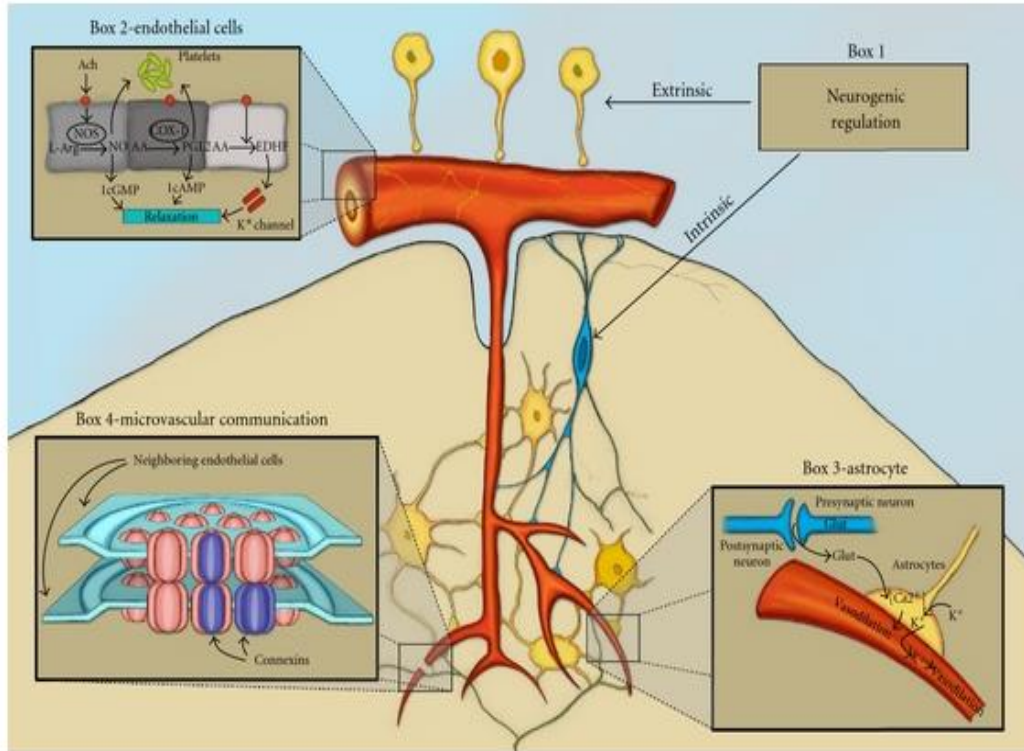
c) Serebral kan akımının düzenlenmesi

Birçok çalışma serebral kan akımının düzenlenmesinde perivasküler sinirlerin rol aldığını göstermiştir. Endotel hücreleri, astrositler ve perivasküler sinirler karmaşık ilişkiler içinde olup serebral kan akımının düzenlenmesinde rol alan temel nörovasküler ünedir. Farklı nörotransmitter ve farklı kökenlere sahip bu perivasküler sinirler intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ekstrinsik perivasküler sinirler parankim dışındaki perivasküler innervasyonu ifade etmektedir. Sempatik, parasempatik ve duyuşal ganglionlar olan sırasıyla süperior servikal ganglionlar, sfenopalatin ve trigeminal ganglionlar bu ekstrinsik perivasküler sinirlerin kaynağını oluşturmaktadırlar. Sempatik sistem serebral oteregülasyonun düzenlenmesinde kan akımının üst sınırının altında tutmakla görevli iken parasempatik sistem daha çok patoloji varlığında görev alır. Ağrıda temel rol alan trigeminovasküler sistem ise güçlü bir vazodilatatör olan kalsitonin geni ile

ilişkili peptidin (CGRP) kaynağı olduğu gösterilmiştir. Böylece vazokonstrüksiyona kaşı rol almaktadır.

Vasküler yapılar parankime girip virchow-robins boşluklarını terk ettikten sonra ekstrinsik innervasyonlarını kaybederler ve intrinsik innervasyon başlar. Bu intrinsik perivasküler sinirler doğrudan vasküler yapılarla temas halinde olmayıp astrosit ayakçıklarıyla ilişki halindedirler. Uyarılara bağılı olarak serebral kan akımını artırıp azaltabilirler (Şekil 3). Serebral mikrovasküleritenin uyarılmasının temel kaynağını lokus seruleus, bazal nukleus ve raphe nukleusu oluşturmaktadır. Ancak bu nöronların mikrovasküler yapıyla direkt temas halinde mi yoksa astrosit ayakçıkları aracılığıyla ilişki halinde oldukları net değildir.

Bu yolların yanı sıra lokal interöronlar da mikrovasküler tonusun düzenlenmesinde rol alırlar. Son çalışmalarda GABAerjik nöronların uyarılmasıyla vazodilatasyon meydana geldiği gösterilmiştir.



Şekil 3. Serebrovasküler kontrolün birçok mekanizmayla düzenlenmesi (55)

d) Endotel

Serebral kan akımının düzenlenmesinde endotel temel rol oynamaktadır. Daha önceden sadece antitrombotik bariyer olarak kabul edilen endotel günümüzde vasküler lümenle vasküler düz kaslar arasında köprü görevi gören dinamik bir yapı olarak kabul edilmektedir. Endotel 4 temel kimyasal sistemden oluşmaktadır: NO, endotelden türetilmiş hiperpolarizasyon faktörü (EDHF), eikosanoidler ve endotelinler.

e) Astrositler

Astrositler, serebral kan akımının belirlenmesinde çok hayati görev üstlenmektedirler. Ayakçıklarıyla vasküler yapılara sıkıca tutunup serebral mikrovasküler yapıları birbirine bağlar. Başlangıçta hücre dışı potasyumu tamponladıkları düşünülen astrositler son zamanlarda yapılan in vitro çalışmalar nöronlar ve vasküler yapılar arasında iletişimi sağladıkları da gösterilmiştir. Eski çalışmalar astrositlerin serebral kan akımının düzenlemesini potasyuma bağlı olduğunu gösterirlerdi. Astrositler, hücre dışı potasyumu alıp ayakçıklarına iletilmesini gösteren çalışmalar yapıldı. Bu da nöronal aktivitenin vazodilatasyon üzerindeki etkisi olarak değerlendirildi. Daha sonra Zonta ve ark. yaptığı çalışmada astrositlerin elektriksel uyarılmasıyla hücre içi kalsiyumun da arttığını ve astrosit ayakçıklarıyla temas eden vasküler yapılarda dilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (57). Bu çalışmalarda glutamat reseptörlerini eksprese eden astrosit ayakçıklarının sinaptik uyarıyı algıladığı ve temas halinde olduğu vasküler yapılarda vazodilatasyon yaparak yanıt verdiği gösterildi.

2.3. İskemik İnmede Patofizyoloji

İskemik inme gelişim süreci oldukça karmaşık bir dizi olayların meydana gelmesi sonucu ortaya çıkar. Bu olaylar başlıca;

- Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği
- İskemik çekirdek ve Penumbra

- Eksitotoksisite
- Oksidatif stres
- Kan beyin bariyer bozukluğu
- Mikrovasküler bozukluklar
- Hiperkoagulasyon ve trombosit aktivasyonu
- İnflamasyon
- Hücre ölümü
- Reperfüzyon hasarıdır(58).

2.3.1. Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği

İskemik inme, beyne gelen kan miktarındaki azalma sonucu ortaya çıkan nörolojik hasardır. Genel olarak en sık nedenler tromboz veya embolidir. Bunlar dışında küçük penetran damarların ani tıkanması, arterit, hematolojik bozukluklar, diseksiyon da hipoperfüzyona neden olabilir. Beyin enerjisinin neredeyse tamamını oksidatif fosforilasyonla sağlamaktadır. ATP yetersizliği durumunda iyon pompaları bozulur ve nöron ve glial hücrelerde depolarizasyon meydana gelir. Yetersiz oksidatif fosforilasyon sonucu olarak anaerobik solunum ve laktat artar. Artan laktat seviyesi ise enfarkt genişlemesi ve kötü sağkalımla ilişkilidir(58,59).

2.3.2. İskemik çekirdek ve penumbra

İskemik inmede kan miktarı 10 mL/ 100 gr doku /dakika altına düşen bölgeler iskemik çekirdek (core) olarak adlandırılır. Bu hücreler inmeden birkaç dakika sonra fonksiyonlarını kaybederler. Kan miktarı <25 mL / 100 gr doku /dakika altına düştüğü, iyon kanallarını korumak için yeterli ancak elektriksel aktiviteyi sürdürmek için yetersiz olduğu alana ise penumbra denir. Penumbra işlevsel olarak bozuk ancak yapısal olarak sağlam bir bölgedir. Hipoperfüzyon düzeltildiği zaman penumbradaki hücreler fonksiyonlarını tekrar kazanarak hücre ölümünden kurtulurlar. Bu nedenle iskemik inme tedavisinde penumbra asıl hedeftir. Penumbranın kurtarılabilir olmasından dolayı zaman beyindir aforizması ortaya çıkmıştır. Hipoperfüzyonun devam etmesi durumunda enfarkt iskemik çekirdekten penumbraya doğru yayılır ve

kurtarılabilir dokular da kaybedilir. Penumbra ile iskemik kor ayrımı yapmak tedavi planlanmasında oldukça etkilidir. İskemik inmede rtPA tedavisi 4,5 saat ile sınırlıyken büyük penumbraya ve küçük iskemik çekirdeğe sahip hastalarda 4,5 saat ile sınırlanırılan rTPA tedavisi 12 saate kadar uzayabilir. İskemik çekirdek ve penumbra ayrımı radyolojik olarak PET, SPECT, perfüzyon CT, perfüzyon MRG ve Diffüzyon MRG ile yapılabilir (60).

2.3.3. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite hücrelerden anormal eksitatör nörotransmitter salınması ve bunların neden olduğu sekonder hasardır. ATP azalması durumunda Na/K ATPaz pompasının fonksiyonu bozulur ve depolarizasyon meydana gelir. Hücre içine sodyum, klor girişi hücre dışına potasyum çıkışı olur. Aynı zamanda kalsiyum transportunda görevli pompalarda da hasar meydana gelir, hücre içi kalsiyum artışı başlar (61). Enerji ihtiyacı karşılanmayan hücrelerde eksitatör nörotransmitterler özellikle glutamat seviyesinde artış olur. Glutamat hücre dışında birikmeye başlar. Artan glutamat NMDA, AMPA, kainat reseptörlerine bağlanarak sodyum, klor, kalsiyum taşınmasını sağlar. Böylece bu nöronlar daha fazla depolarize olarak daha fazla glutamat salınımına neden olarak iskemik kaskada katılırlar. Hücre içinde artan kalsiyum; kalpain, fosfolipaz, endonüklez, adenosin trifosfataz, siklookijenaz, nitrik oksit sentetaz gibi enzimleri aktive eder. Bu mekanizmalarla mitokondriyal ve endoplazmik retikulum hasarına, hücre membran hasarına, serbest radikal oluşumuna, NO üretimine, DNA hasarına, hücre şişmesine ve ölümüne neden olur. Ekzotoksisite aynı zamanda iskemi sonrası inflamasyona yol açan yolları da aktifler.

2.3.4. Oksidatif stres

Beyin vücut ağırlığının %2 sini oluşturmasına rağmen vücuttaki total oksijenin yaklaşık %20 sini alır. Bu nedenle nöronlar oksijene oldukça duyalıdır(62,63). Beyindeki antioksidan seviyesi vücudun diğer bölümlerine göre daha düşüktür. Glutamatın artmasıyla tetiklenen hücre içi kalsiyum artışı ksantin oksidazı,

NADPHoksidaz sentazı, NO sentazı aktifleyerek serbest oksijen radikal oluşumuna neden olur. Oksijen-antioksidan arasındaki dengenin bozulması sonucu hücre hasarları ortaya çıkar. Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin aşırı üretilip antioksidan savuma sisteminin kapasitesini aşması durumunda ortaya çıkar. Başlıca bu serbest oksijen radikalleri; süperoksid anyonu, hidroksil radikali, lipid radikali ve nitrik oksittir. Normalde hücrelerde düşük seviyelerde bulunan bu radikaller birçok önemli fonksiyonlarda rol alırlar. Aşırı üretilen bu radikaller proteinlere, yağ asitlerine, lipitlere, DNA'ya zarar verirler(64). Ayrıca başta metalloproteinaz-9 olmak üzere diğer metalloproteazları aktive ederek ve endotel hasarına neden olarak kan beyin bariyerini de bozarlar.

2.3.5. Kan Beyin Bariyer Bozukluğu

Kan beyin bariyeri (KBB) endotelyal hücreler, bazal lamina, astrositler, perisitler, nöronlar ve hücre dışı matrixten oluşur(65). İskemiden 2 saat sonra endotelyal bazal membran fonksiyonu bozulmaya başlar(66). Bunu KBB geçirgenliğindeki artış izler. KBB fonksiyon bozulduğuna bradikinin, trombin, vasküler endotelyal growth faktör, matriks metalloproteinaz ve diğer protezların birikmesi neden olur. Oksidatif stres daha önce anlatıldığı gibi kan beyin bariyeri fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunur ve endotelyal hücrelerden, glial hücrelerden ve nöronlardan matris metalloproteinaz (mmp) 9 salınımını tetikler. Enfarktattan 24-72 saat sonra KBB' nin bozulmasının 2. aşamasına geçilir ve bu süreçte lökosit infiltrasyonu meydana gelir. Sonuç olarak enfarktattan 24-72 saat sonraki dönemde daha fazla doku kaybı görülür. KBB bozukluğu sonucu olarak beyin parankimine sızıntılar olur. Sızan büyük moleküllü bileşenler suyu da beraberlerinde ekstrasvasküler alana çekerler. Sonuç olarak vazojenik ödeme de neden olurlar(67).

2.3.6. Mikrovasküler hasar

İskemi, otoregülasyonu ve endotel hücrelerin fonksiyonlarını bozarak mikrovasküler hasara neden olur. Serebral otoregülasyon değişen kan basınçlarına rağmen serebral perfüzyon basıncı belli aralıklarda tutabilme yeteneğidir. İskemide bozulan serebral

perfüzyon basıncı arteryel dilatasyonla korunmaya çalışılır. Bunda vasodilatasyondan sorumlu mekanizmalar (hipoksi, adenozin, asidoz, karbonmonoksit), myojenik faktörler ve endotelial faktörler (endotelin 1, nitrik oksit, prostasiklin...)rol alır. İskemide bozulan otheregölasyonun patofizyolojisi hala tartışmalı olmasına rağmen iskeminin endotel hasarına neden olduğu bilinmektedir. Endotel hasarı meydana geldiğinde nitrik oksit, endotelin 1, prostasiklin salınımında artış olur. Bunlar vasküler tonusu artırarak penumbranın beslenmesini daha da bozarlar. Mikrovasküler hasar sonucu lökosit endotel adhezyonuna neden olarak sadece iskemi sonrası inflamasyona neden olmayıp aynı zamanda besleyici arterlerin reperfüzyonundan sonra distal damarlarda akım yokluğu olarak bilinen no reflow fenomenine de neden olur.

2.3.7. Hiperkoagölasyon ve trombosit aktivasyonu

Trombozis ve trombosit aktivasyonu iskemi patofizyolojisinde temel rol oynar. Endotel hasarında doku faktörü artar. Doku faktörü, faktör VIIa ve fosfolipitlerle beraber faktör IX ve faktör X'u aktifler. Faktör X, protombinaz kompleksiyle birlikte protrombinden trombin oluşumunu tetikler. Trombin, fibrinojenden fibrin oluşumuna yol açarken aynı zamanda fXIII'ü de aktifler(68). Fibrin; eritrositleri, pıhtılaşma faktörlerini, trombositleri yakalar. Fibrin, integrin reseptörü α Ib β 3 yoluyla trombositlere yapışır. Hasarlı damarda trombositler 2 saat içinde toplanmaya başlar. Trombositler de çeşitli biyokimyasal mediyatörler salgırlar. Salgıladıkları tromboksan A2 ve serbest oksijen radikalleri geçici vazospazma neden olurken aynı zamanda lökosit migrasyonu için salınan kemotaktik mediyatörlerle de inflamasyonu daha da şiddetli hale getirir(69).

2.3.8. İnflamasyon

İskemik inmede nekrotik dokulara karşı inflamatuvar bir yanıt oluşur. İskemik endotelial hücrelerin salgıladığı sitokinler/kemokinler mikrogliaları aktive eder. Aktive olan mikroglialar, adhezyon moleküllerinin salınımını tetikleyen proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. Bu olaylar enfarkt başlangıcından sonra ilk 24

saatte meydana gelir. Kemokinler, immun sistem hücrelerinin özellikle penumbra çevresinde toplanmasına neden olurlar. Adhezyon molekülleri (selektinler, integrinler, immüoglobulin süper ailesi) lökosit-endoel adhezyonuna neden olarak mikrovasüel oklüzyona neden olurlar. Bu da hipoperfüzyona ve no reflow fenomenine neden olur. Aynı zamanda lökositlerin iskemik beyin parankimine girmesine neden olurlar. İnflamasyon hücreleri kan beyin bariyerini de bozup hasarı daha da şiddetlendirirler. İskemi sempatik sistemi ve hipotalamo hipofizer-adrenal aksı da aktifleyerek dolaşımdaki bağışıklık hücrelerin beyne girişinde rol oynar. Bu da iskemide dolaşımdaki bağışıklık hücre sayısını azaltıp daha fazla bulaşıcı komplikasyonlara yol açar.

İnflamatuvar hücrelerden olan lökositler, hem endotel duvarına yapışarak hem de serbest oksijen radikalleri, proteaz, jelatinaz, kollajenaz üreterek kurtarılabılır vasküler yapılara ve parankimal dokuya zarar verir. Lökositler ayrıca trombosit agregasyonuna ve vazokonstriksiyona neden olan PAF, prostoglandinler, eikozanoidler, lökotirenler salgılar. İskemik beyne en erken giren lökosit nötrofillerdir. Geçici iskemiden 4-6 saat sonra kalıcı iskemiden ise 12 saat sonra iskemik dokuda görülürler.

İskemik inmede inflamasyonda rol alan bir diğeri hücre lenfositlerdir. Bunlar nötrofillerden yaklaşık 3-6 gün sonra iskemik dokuda görülürler. Bunlar da proinflamatuvar sitokinler üretirler. B lenfositlerden ziyade T lenfositler rol alırlar. İnflamatuvar hücrelere ek olarak astrositler de inflamasyonda rol alan moleküller üretirler. Astroglial yanıt iskemiden yaklaşık 4-24 saat sonra başlar. 28 güne kadar uzayabilir. Nöronlar, astrositler, endotel hücreleri tarafından üretilen ve TNF süper ailesi üyesi olan TWEAK, astrositlerdeki Fn14 reseptörüne bağlandığında proinflamatuvar moleküller salgılanır.

İnflamasyonda rol alan temel mediyatörler ise sitokinler, kemokinler, araşidonik asit metabolitleri, nitrik oksid/nitrik oksid sentetaz ve metalloproteinazlardır.

İskemik enflamatuvar yanıtta gen ekspresyonunun indüklendiği artık iyi bilinen bir konudur. Bu transkripsiyon faktörleri Nükleer faktör (NF-kB) ,Mitogen-Activated Protein Kinazdır (MAPK)(70,71).

2.3.9. Hücre ölümü

İnme sonrası yeniden onarıcı sistemlerle hasar verici sistem arasında hassas bir denge vardır. Hasar verici sistemler daha baskın olduklarında hücre ölüm mekanizmaları devreye girer. Bunlar: apoptozis, nekroz, nekroptoz ve piroptozdur.

Apoptozis: Ekzositozla artan kalsiyum mitokondrilerde birikir. Fonksiyonu bozulan mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c daha sonra hücre ölümüne neden olacak olan kaspazları aktive eder. Apoptozun ana etkenleri bu kaspazlardır. Apoptoz enerji bağımlı bir olaydır ve enerji üretimi devam eden penumburada etkindir. Mitokondrideki apoptoz, esas olarak proapoptotik (bax, bak) veya antiapoptotik (bid, bcl 2) olan b hücreli lenfoma-2 (bcl-2) tarafından düzenlenir(72). Proapoptotik proteinler sitoplazmaya salındıktan sonra kaspazları aktive ederler. Kaspaz 3 apoptozu yöneten ve son kaspazdır. Bu enzim proteinleri, nükleotidleri ve enzimleri keserek hücre ölümüne neden olur. Apoptozisde hücre membran yapıları son ana kadar korunur ancak nekroz hücre sel şişme ve hücre membran bozukluğuyla başlar. Mitokondrinin yanı sıra endoplazmik retikulum da kaspazları aktifleyerek hücre ölümüne neden olur(73).

Nekroz: İskemik çekirdekte kan miktarının azalması sonucu hücrelerin ihtiyacı olan ATP karşılanamaz. Yetersiz ATP, hücre membranında bulunan Na/K ATPaz pompasının fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. Bu pompanın fonksiyonu bozulunca hücre içi sodyum miktarı artar. Sodyumla beraber su hücre içine çekilir ve hücre sel şişme başlar. Bu olay devam ederse hücre zarı parçalanarak hücre içeriği hücre dışına çıkar. Bu hücre içi içeriğin dışarı salınması inflamasyona neden olur. Hücre içeriğin dışarı salınması, hücre membran bozukluğu, sitoplazmanın vakuolizasyonu, proinflamatuvar maddelerin varlığı ve ölen hücrelerde ve çevrelerinde inflamasyonun varlığı nekrozun morfolojik özellikleridir.

Nekroptoz: Nekrozun apoptozdan farklı olduğu düşünülüyordu. Ancak son çalışmalar nekrotik hücre ölümlerin tanımlanmış moleküler yollarla yönlendirilebileceği gösterilmiştir. Nekroptoz, reseptör-interacting protein kinaza-1 (RIPK1) bağlı hücre ölümüdür. İskemiden hemen sonra lizozomal enzimlerin sitoplazmaya salındığı ve bunun da nekrozda olduğu gibi membran hasarı sonucu

olduğu düşünöldü. Aynı nöronlar apoptoz markerları olan kaspaz 3 ve sitokrom c salınımı da gösterdiler.

Piroptoz: Enflamatuvar hücre ölüm mekanizması olan piroptosis diğer mekanizmalardan farklı olarak kaspaz 1'e bağımlıdır. Piroptozu uğrayan hücrelerde plazma membran rüptürü, proinflamatuvar içeriğin hücre dışına salınması, DNA hasarı ile henüz bilinmeyen bir mekanizmayla kaspaz 1 bağımlı hücre ölümü görölr(74).

2.3.10. Reperfüzyon hasarı

Enfarkt alanına kan akışını yeniden sağlamak kurtarılabılır doku olan penumbra için çok önemli olup klinik sağkalımı da oldukça etkilemektedir. Bununla beraber reperfüzyon paradoksal bir şekilde hasarı daha da artırabilir. Erken rekanalize olan hastalarda mikrovasküler hasara bağlı olarak hemoraji riski artar. Lökositler endotel hasarına, mikrosirkülayonda obstrüksiyona, kan beyin bariyerinin bozulmasına, beyin dokusuna infiltre olarak reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Plateletler de biyokimyasal mediyatörler salgılayarak reperfüzyon hasarında rol alır. Deneysel çalışmalar kompleman aktivasyonunun da reperfüzyon hasarının önemli bir bileşeni olduğunu göstermiştir. Ayrıca iskemi sonrası hiperperfüzyon ödeme ve kanamaya neden olur.

2.4. İskemik İnmede Nöroproteksiyon

Nöroproteksiyon, iskemik hasarla sonuçlanabilecek biyokimyasal ve moleküler olayların engellenmesi veya yavaşlatılmasıyla hücrelerin iskemiden korunmasıdır. İskemide kullanılan nöroprotektif ajanların temel hedefi kurtarılabılır doku olan penumbrayı kurtarmaktır. Hayvan deneylerinde oldukça faydalı olan birçok ajan insanda işe yaramamaktadır. Bu nedenle günümüzde standardize edilmiş nöroprotektif ajan yoktur. Hücre ölüm mekanizma basamaklarını hedefleyen nöroprotektif ajanlar şunlardır:

- Anti eksitotoksisite: İskemi sırasında azalan ATP hücrelerdeki iyon pompa fonksiyonlarının sürdürölememesine neden olurken hücre dışında glutamat

birikir. Biriken glutamat AMPA ve NMDA reseptörlerine bağlanarak hücre içi kalsiyum ve sodyum miktarını artırır. Artan kalsiyum miktarı oldukça sitotoksiktir. Nöronların soma ve dentritlerinde bulunan, lizozomal olmayan sistein proteaz olan μ -calpain, kalsiyum bağımlı olup bu sitotoksik etkiden sorumludur(75). μ -calpainin patolojik aktivasyonu, kaspaz 7 gibi apoptozisten sorumlu proteazların ve translasyonun başlamasına neden olur(76). Bu yolları bloke etmek için birçok farmakolojik ajan çalışılmıştır. Bu çalışmaların temeli glutamatın eksitator aktivitesini engellemeye yöneliktir. Non kompetitif NMDA reseptör antagonisti olan dekstrometorfan, bu amaçla kullanılan ajanlardan biri olup insan çalışmalarında beklenen etkiyi göstermemiştir(77). Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve NMDA reseptör antagositi olan magnezyum da eksitotoksisiteyi önlemeye yönelik kullanılan ajanlardan biridir. Ratlarda enfarkt alanını azaltmasına rağmen İnme İntravenöz Magnezyum Etkinliği denemesinde (IMAGES), 2589 hastaya inmeden ortalama 7 saat sonra iv magnezyum verilmiş olup 90 gün sonra mortalite ve morbidite açısından anlamlı fark görülmemiştir(78). Araştırmacılar, bu sonucu magnezyumun geç kullanılmasına bağlamaktadırlar.

- Antioksidanlar: İskemi patofizyolojisinde yer alan en önemli faktörlerden biri de reaktif oksijen radikalleridir. Antioksidanlarla reaktif oksijen radikalleri arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres mekanizmaları süperoksit ve NO üretimine kadar izlenebilmektedir(79). Bu iki molekül kan akımı ve nörotransmisyon düzenlenmesinde çok önemli görevler almaktadırlar. Vücudu reaktif oksijen radikallerin zararlı etkilerinden korumak için endojen ve ekzojen birçok antioksidan bulunmaktadır. Endojen antioksidanlar; antioksidan enzimler (superoksidismutaz) ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlarla (ürük asit, askorbik asit, e vitamini)reaktif oksijen radikallerinin zararlı etkilerini engellemeye çalışırlar. SOD, sitozolde ve mitokondri membranlar arası boşukta bulunan SOD1(Cu, Zn-SOD), mitokndri sitoplazmasında bulunan SOD2 (MnSOD) ve prokaryotlarda blunan SOD 3(Ni-SOD olmak üzere 3 tiptir. Reaktif oksijen radikallerinin kaynakları, araşidonik asit

metabolizması, fonksiyonu bozulan mitokondri ve aktif hale gelen nötrofilerdir. Beyin ayrıca radyasyon, ksenobiyotikler, ilaçlar gibi eksojen kaynaklı serbest oksijen radikallerine de maruz kalır. Resveratrol, askorbik asit, e vitamini, selenyum, koenzim Q10, albümin, omega 3, polifenoller, flavinoidler başlıca doğal antioksidanlar olup diyetle alınması oksidatif strese karşı oldukça önemlidir.

NADPH oksidaz (NOX) oksijeni süperoksit anyonuna dönüştürür. NOX'un altı alt grubu bulunmaktadır. Bunlardan NOX2 ve NOX4 iskemik inmede oksidatif strese büyük katkıda bulunur. NOX inhibitörleri (apocynin, rosiglitazon, difenileniodonyum) ümit verici tedavi olmasına rağmen düşük özgüllükleri ve birçok yan etkileri olmasından dolayı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

- Antiinflatuvar: Hipoperfüzyonla başlayan iskemik inme, ekzotoksisiteye ve oksidatif strese neden olur. Bu da mikrovasküler hasara ve kan beyin bariyer disfonksiyonuna neden olur ve iskemi sonrası inflamasyon başlar. Beynin yerleşik makrofaları olan mikroglialar iskemide aktive olarak çeşitli sitotoksik ve sitoprotektif maddeler salgırlar. Başlıca beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) salgılayarak nöroprotektif etki gösterirler. Mikrogliaların TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflatuvar sitokinlerin yanı sıra reaktif oksijen radikalleri (ROS), NO gibi sitotoksik molekülleri de salgıladığına dair çalışmalar mevcuttur(80,81). Ayrıca astrositler ve nöronlar da mikroglialar gibi sitokin, kemokin gibi inflamatuvar faktörleri salgılayabilirler. İskemik inmede en çok tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-20, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) - β sitokinleri çalışılmıştır. Bunlardan TGF- β ve IL 10 nöroprotektifken IL-1 β ve TNF- α hasarı şiddetlendirir. IL 10, IL-1 β ve TNF- α 'yı baskılayarak antiinflatuvar etki gösterir. İskemi sonrası IL-1 β artışının enfarkt hacmini arttırdığını gösteren çalışmalar da vardır(82). Monosit kemoatraktan protein 1 (MCP 1), makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α) ve fraktalin gibi kemokinler de lökosit infiltrasyonunu artırarak inflamasyona katkıda bulunurlar. Lökositlerin yapışma ve hareketinden sorumlu olan hücre adhezyon molekülleri (CAM) de inflamasyonda oldukça

önemli rol almaktadırlar. İskemik inmede bugüne kadar anti CAM tedavisi etkili olamamıştır. Bu nedenle anti CAM tedavisinin daha fazla araştırmaya ihtiyacı vardır. Mikroglialar, astrositler, nöronlar ve endotel hücreleri tarafından üretilen metalloproteinazların da kan beyin bariyerinin yıkımı, ödem ve kanamanın patofizyolojisinde yer aldığı gösterilmiştir. MMP 2 ve MMP 9 serebral iskemide rol alır. Nöroinflamasyonla ilişkili esas MMP 9 sorumludur. MMP 9 inhibisyonu enfarktı azalttığı gösterilmiştir. İskemik inme immun sistemi de baskılayarak hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yatkın hale getirir. Düzenleyici T lenfositlerinin (T_{reg}), iskemik inmede hücreleri korumada çok önemli rolü vardır. Kanlarında T_{reg} hücreler olmayan farelerdeki iskemik inme olanlara göre daha fazla morbiditeye neden olduğu gösterilmiştir. IL 10 da T_{reg} hücreleri tarafından üretilir. Böylece T_{reg} hücreleri hücreleri aşırı proinflamatuvar sitokin üretimine karşı koruyarak enfarktın büyümesini engeller.

- Anti apoptozis: BCL 2 ve BCL-xL'nin seviyeleri iskeminin ilk birkaç saatinde azalır. BCL 2'nin inhibisyonu apoptozise yol açar. Ancak buna rağmen BCL 2 seviyeleri arttırılmaya çalışılmaz. Çünkü BCL'nin aşırı üretimi başta lenfoma, lösemi olmak üzere birçok b hücreli malignitelere neden olmaktadır. Kaspazlar, apoptoziste rol alan sistein protezlerdir. Kaspazların peptid inhibitörleri (z-VAD.FMK), IL-1 β seviyelerini azaltarak doku hasarını azaltır. IL-1 β reseptör antagonistinin (IL-1RA) serebral iske mi modellerinde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Bu kaspaz inhibitörlerinin geçici fokal iskemide nöronal hasarı azalttığı ancak yaygın iskemide etkili olmadığı gösterilmiştir. Manabat ve ark. yaptığı bir çalışmada geçici MCA oklüzyonundan 24 saat sonra kaspaz 3 aktivitesinde artış gözlemlenmişken, kalıcı MCA oklüzyonundan 24 saat sonra kaspaz 3 aktivitesinde artış gözlenmemiştir.(83,84,85,86)

2.5. Deneysel Serebral İskemi Modelleri

İnme, mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir. İnmelerin yaklaşık %88'ini iskemik inmeler oluşturmaktadır. Vasküler patolojilere bağlı meydana gelen serebral foksiyon bozukluğu olarak tanımlanan inmede bir dizi olaylar meydana gelir. Bu olaylar sonucu enfarktın merkezinde kurtarılabilir doku olan penumbroyu kurtarmak iskemik inme tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla günümüzde penumbroyu kurtarmak için 2 tedavi yaklaşımı ön plana çıkmaktadır. Bunlardan biri nöroproteksiyonken diğeri ise rekanalizasyondur. Rekanalizasyon için trombolitik ilaçlar ve mekanik cihazlar kullanılmaktadır. Rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rtPA) ile intravenöz tromboliz akut iskemik inmede onaylanmış tek medikal tedavidir. Ancak rtPA iskemik inmeden sonra 4,5 saat içinde uygulanabilmesi nedeniyle iskemik inme vakalarının sadece %5'inde kullanılmaktadır(87). Bundan dolayı daha yaygın kullanılabilen tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla çalışmaları ilerletmek için çeşitli hayvan iskemi modellerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hayvan iskemi modellerinde en çok ratlar kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni çalışmaların tekrarlanabilir olması yanı sıra rat damarlarının anatomi ve fizyolojisinin insaninkilere benzemesi, parametrelerin kolayca izlenebilmesi, türleri arasında homojenlik olması, beyin dokularının kolayca fikse edilebilmesidir.

İskemi modelleri fokal ve global iskemi modelleri olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

2.5.1. Fokal Serebral İskemik İnme Modelleri

a- İntraluminal suture MCAo modeli

İskemik inmelerin yaklaşık %70'i MCA oklüzyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çalışmalarda daha çok MCA oklüzyonu üzerinde durulmaktadır. MCAo modellerinde yaygın olarak 2 teknik kullanılmaktadır. Bunlardan biri karotis kommunis geçici olarak bağlanıp suture buradan MCA tıkanıcaya kadar ilerletilir.

Diğer bir teknik ise external karotid arter kesilerek suture internal karotid arterden ilerletilerek MCA bifurkasyonuna kadar ilerletilip MCA'ya kan akışı kesilir. External karotid arterin kesilmesi anatomik bütünlüğü bozmadığı için reperfüzyon için anlamlı bir kan akış eksikliğine neden olmaz. Bu nedenle bu teknik daha ideal bir tekniktir.

MCAo tekniğinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Avantajları; bu iskemi modelinde insanlardaki gibi bir penumbra alanı oluşmaktadır, iskemi süresi ve reperfüzyon kolayca kontrol edilebilir, işlemin yapılması kolaydır. Dezavantajları ise suture çeşidine bağlı olarak yetersiz oklüzyona neden olabilir, subaraknoid kanamaya neden olabilir, tromboliz çalışmaları için uygun değildir.

b- Kraniektomi modeli

Kraniektomi gerektiren bu modelde MCA'yı doğrudan ortaya çıkarmak gerekmektedir. Distal MCAo için 2 teknik geliştirilmiştir. Birinci teknik parotis, temporal kas, zygomatik ark ve MCA'yı örten kafatasının çıkarılması şeklindedir(88). Daha sonra MCA elektrokoagülasyon, fotokimyasal, mikroanevrizma klipsler gibi yöntemlerle oklüde edilir. 3 damar oklüzyon (3VO) modeli denilen ikinci teknikte ise ek olarak kollateral dolaşımı da minimale indirmek için her iki karotis kommunis de tam veya kısmi oklüde edilir. Bu yöntemde frontal, temporal, paryetal, oksitipal korteksin büyük çoğunluğunda iskemi oluşturur.

Bu modelin avantajları; MCAo direkt olarak gözle görülebilir, düşük mortaliteyle dezavantajları arasında yüksek cerrahi teknik bilgi gerektirmesi, parankim hasarı, vasküler hasarlar, kafa içi basıncını etkilemesi sayılabilir.

c- Fototromboz modeli

Bu model parankimde iskemik lezyonlara neden olan fotooksidasyona dayanmaktadır. Fotoaktif boya (eritrosin B, Rose bengal) ratlara intravenöz yolla verilir. Kafatası belirli dalga boylarında ışık demetleriyle dakikalarca ışınlanır. Işınlanan bölgelerde trombosit aktivasyonuna, endotel hasarına neden olan oksijen radikalleri üretilir. Bu modelde ışınlama alanı stereotaktik koordinatlar kullanılarak istenilen bölgede iskemi indüklenebilir.

Bu modelin en önemli avantajları belirlenebilen bölgelerde iskemi indüklenebilmesi, tekrarlanabilir olması, düşük mortalite ve kısa süren cerrahi süredir. Dezavantajları ise nöroprotektif ajan çalışmanın uygun olmaması, hızlı gelişen iskemik hasar insan iskemisinde karakteristik olmayan vazojenik ödeme neden olması sayılabilir.

d- Endotelin -1 modeli

Güçlü ve uzun etkili vazokonstriktör olan ET-1, doğrudan beyne enjekte edildiğinde kan akışını iskemik inme oluşacak seviyelere kadar düşürür. ET-1, kortexe topikal uygulanarak, intraserebral enjeksiyon, MCA yakınına enjeksiyon gibi yöntemler kullanılarak fokal iskemi indüklenebilir.

ET-1 modelinin avantajları; işlemin basit ve hızlı olması, mortalite ve morbiditenin düşük olması, vazokonstriktör derecesi verilen ilaç dozuyla ayarlanabilmesi, ekstrakraniyal damarların manipülasyonuna gerek olmaması sayılabilir. Dezavantajları ise iskemi süresinin kontrol edilememesi, tekrarlanabilirliğinin zor olmasıdır(89,90).

e- Embolik inme modeli

Embolik inme modeli 2 gruba ayrılır. Bunlardan biri tromboembolik pıhtı modeli diğeri ise mikrosfer/makrosfer kaynaklı iskemi modelidir. Mikrosfer modelinde dextran, TiO₂, seramik gibi farklı maddeler kullanılarak çapları 20–50 µm arasında olan küreler kullanılmaktadır. Bu küreler external karotid arter aracılığıyla İKA veya MCA'ya yerleştirilir. Enjeksiyondan 24 saat sonra iskemi alanı büyümeye başlar. Kürelerin boyutu ayarlanarak iskemi alanının büyüklüğü ayarlanabilir. Makrosfer modelinde kullanılan kürelerin çapları ise 100–400 µm olup bu küreler İKA'ya yerleştirilir(91).

Tromboembolik pıhtı modelinde otolog kandan trombin kaynaklı pıhtıların ya da kendiliğinden oluşan pıhtıların enjekte edilmesi modelidir. Trombin İKA'nın intrakranial segmentine ya da MCA'ya direkt olarak da enjekte edilebilir. Bu iskemi modeli insanlarda görülen vasküler oklüzyon mekanizmasını yakın taklit etmesi, trombolitik ajanların çalışılmasına olanak vermesi nedeniyle etkili bir iskemi

modelidir. Enjekte edilen trombüs endojen tromboliz veya trombüs ekstravazasyonu nedeniyle amaçlanan iskemi meydana gelmeyebilir. Bu nedenle pıhtı içeriği oldukça önemlidir. Pıhtının çözülmesi içindeki trombin ve eritrosit yoğunluğuna bağlıdır. Ratlardaki fibrinolitik sistem insanlara göre rtPA'ya on kat daha az duyarlıdır. Bu nedenle ratlarda yaklaşık on kat rtPA (10 mg / kg) kullanılmalıdır(92).

İnsan inmelerindeki patogenezi yakından taklit etmesi, trombolitik ajanların çalışabilmesi bu modelin avantajlarından. Pıhtıların multifokal iskemi oluşturmaları, yüksek oranda otolizin erken ve kontrol edilemeyen reperfüzyona neden olmaları, yüksek mortalite oranları, kanamaya neden olmaları, tekrarlanabilirliğinin düşük olması ise bu modelin dezavantajlarıdır

2.5.2. Global Serebral İskemik İnme Modelleri

a- Dekapitasyon tekniği

Lowry ve ark. tarafından tanımlanan bu teknikte global iskemi ve biyokimyasal olaylar incelenmiştir. Ancak herhangi bir modülasyona uygun olmadığı için kullanımı zordur.

b- Boyun turnike tekniği

Uzun yıllar kullanılan bu teknikte venöz tıkanıklık ve vagus siniri sıkışmasından dolayı iskemi modeli karmaşık hale gelmektedir. Bu tekniğin bir diğer dezavantajı ise vertebral arterler foramen vertebrale içinde olduğundan kapatılamaması ve sonuç olarak global iskeminin istenilen düzeyde olmamasına neden olmaktadır. Modifiye edilen bu teknikte kedi, köpek, maymunlarda daha çok kullanılmış olup boyun turnikesi kapatılmadan önce sistemik tansiyon 50 mmHg seviyelerine düşürülmüştür.

c- Ventriküler fibrilasyon tekniği

Bu teknik daha çok kardiyak arresti taklit etmek için kullanılır. Bazı araştırmacılar bu tekniğe CPR da eklemişlerdir. Genellikle büyük hayvanlarda kullanılan bu teknik ideal olmasına rağmen pahalı ve oldukça yorucudur. Kofler ve ark. bu tekniği

farelere modifiye etmiştir. KCL ile kardiyak arrest oluşturulduktan sonra CPR protokolü uygulanmış. CPR'dan sonra hippokampal ve kaudoputamen hasarı görüldü (93).

d- Sefalik arter oklüzyon tekniği

Ventriküler fibrilasyon iskemisi modelinde tüm vücut iskemisi meydana geldiğinden renal, splenik ve diğer periferik dolaşımı iskemiden koruyacak sefalik arter oklüzyon tekniği geliştirmiştir. Hossman ve ark. oluşturdukları bir kedi modelinde sol subklavian arter ve sağ brakiosefalik arter arkus aortadan dallandıkları yere yakın bağlanır. Karotis kommunis ile anastomoz yapan mammarian arter de bağlanır. Eş zamanlı olarak kan basıncı yaklaşık 50 mmHg seviyelerine düşürülür. Böylece serebral kan akımı minimale indirilmiş olur(90).

e- 4 damar oklüzyon tekniği (4VO)

Pulsinelli ve Brierley tarafından tanımlanan bu teknikte her iki vertebral arter alar foramende koagüle edilir, 1 gün sonra her iki karotis kommunis geçici oklüde edilir(94). Bu teknik hayvanların yaklaşık %50-70'inde başarılı iken iskemisi etkileri ratlar arasında değişkenlik gösterir. Bu farklılık ratlar arasındaki kollateral dolaşım farklılığına bağlanmaktadır. Modelin kullanımının zor olması, çalışmalar arasında farklılık göstermesi, başarı oranının %50-70 arasında olması dezavantajlarındandır.

f- 2 damar oklüzyon tekniği (2VO)

Bu iskemisi modelinde karotis kommunislerde hipotansiyonla geçici oklüzyon oluşturulur. Sadece kanamayla veya fentolamin, trimetofan gibi ajanlarla desteklenmiş kanamayla tansiyon 50 mmHg seviyelerine indirilir. 5-15 dakikalık iskemisi sonrası serebral kan %5 seviyelerine inmektedir. İskemisi sonrası hippokampüste, kaudoputamende ve neokortekte değişiklikler meydana gelir. 2VO tekniğinin 4VO tekniğine göre avantajları; daha basit cerrahi işlem gerektirmesi, reperfüzyonun kolaylıkla gerçekleştirilmesi, düşük mortalite sayılabilir. Ancak çeşitli

ajanlarla hipotansiyon yapıldığında verilerde karışıklığa neden olması dezavantajındandır (95).

g- Derin sistemik hipotansiyon tekniği

Bu teknikte çeşitli ilaçlar kullanılarak sistemik tansiyon 30-35 mmHg seviyelerine indirilip oksijen basıncı %4'lere düşürülerek iskemi modeli oluşturulur.

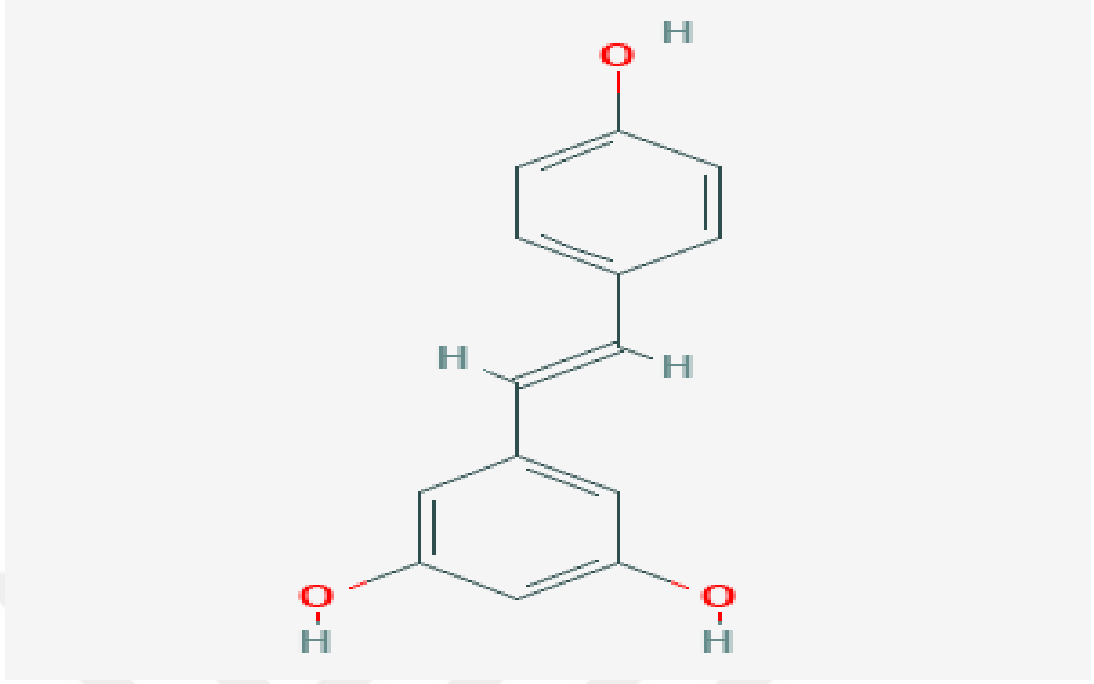
h- Kafa içi basıncı yükseltilmesi tekniği

Bu tetknikte sisterna magnadan sıvı enjekte edilir. Kafa içi basıncı artırılarak ortalama arteryel basıncın 25-50 mmHg üzerine çıkarılır. Böylece serebral kan akımı azaltılır ve geçici iskemi modeli oluşturulur. Ancak ortaya çıkan patoloji sadece iskemiden kaynaklanmayıp esas olarak kafa içi basıncı artışından etkilenmesinden dolayı ortaya çıktığından istenilen sonuçlar elde edilememiş olup kullanımı sınırlı kalmıştır (96).

2.6. İlaçlar

2.6.1. Resveratrol

Resveratrol 228.24 g/mol molekül ağırlığında olup 254 °C erime ısısına sahiptir. Moleküler formülü C₁₄H₁₂O₃'tür. Kimyasal yapısı şekilde gösterildiği gibidir (Şekil 4). IUPAC adı [(E)-2-(4-hidroksifenil) etenil] benzen-1,3-diol'dür. Su, etanol, DMSO, dimetil formamid gibi organik çözücülerde çözünür.



Şekil 4. Resveratrol kimyasal yapısı

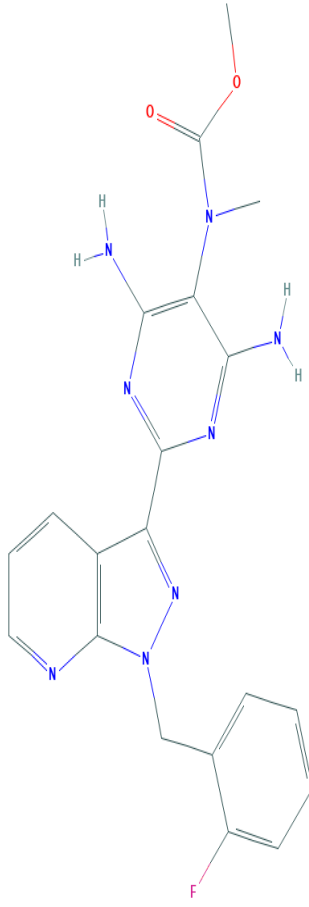
Başlıca nöroprotektif, antiinflamatuvar, antikanserojenik, kardioprotektif olmak üzere birçok etkisi olan bir fitoaleksindir. Üzümde, kırmızı şarapta, yer fıstığında olmak üzere 70'ten fazla bitkide bulunur. Resveratrolün biyoyararlanımı düşük olmasından dolayı modifikasyonu üzerinde yoğun çalışılmıştır. Bu nedenle metoksillenmiş, hidroksillenmiş, halojenlenmiş türevler üretildi. Resveratrol, PI3K / AKT / mTOR ekspresyonunu düzenleyerek iskemik inmede apoptozu, nöronal hasarı ve enfarkt alanını azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur(97,98). Resveratrol JAK2 / STAT3'ü aktive ederek, PI3K / AKT / mTOR ekspresyonunu aktive eder. Aktive olan PI3K / AKT / mTOR, BCL-2'nin artmasına, BAX'in azalmasına ve kaspaz-3'ün bölünmesine yol açarak apoptozu inhibe eder. Yapılan son çalışmalarda resveratrol ayrıca hipokampal nöronları geçici serebral iskemik hasardan koruyabildiğini göstermektedir(98).

Resveratrol, aynı zamanda oksidatif strese karşı SIRT1(sirtuin 1)/AMPK/PGC1 α yolağını etkileyerek mitokondriyal aktiviteyi ve biyogenezi iyileştirir. Tavşan modelinde yapılan bir çalışmada ise resveratrol NF- κ B, TNF- α , İL-6, siklooksijenaz-2, makrofaj enflamatuvar protein-2, oksijen radikallerini ve

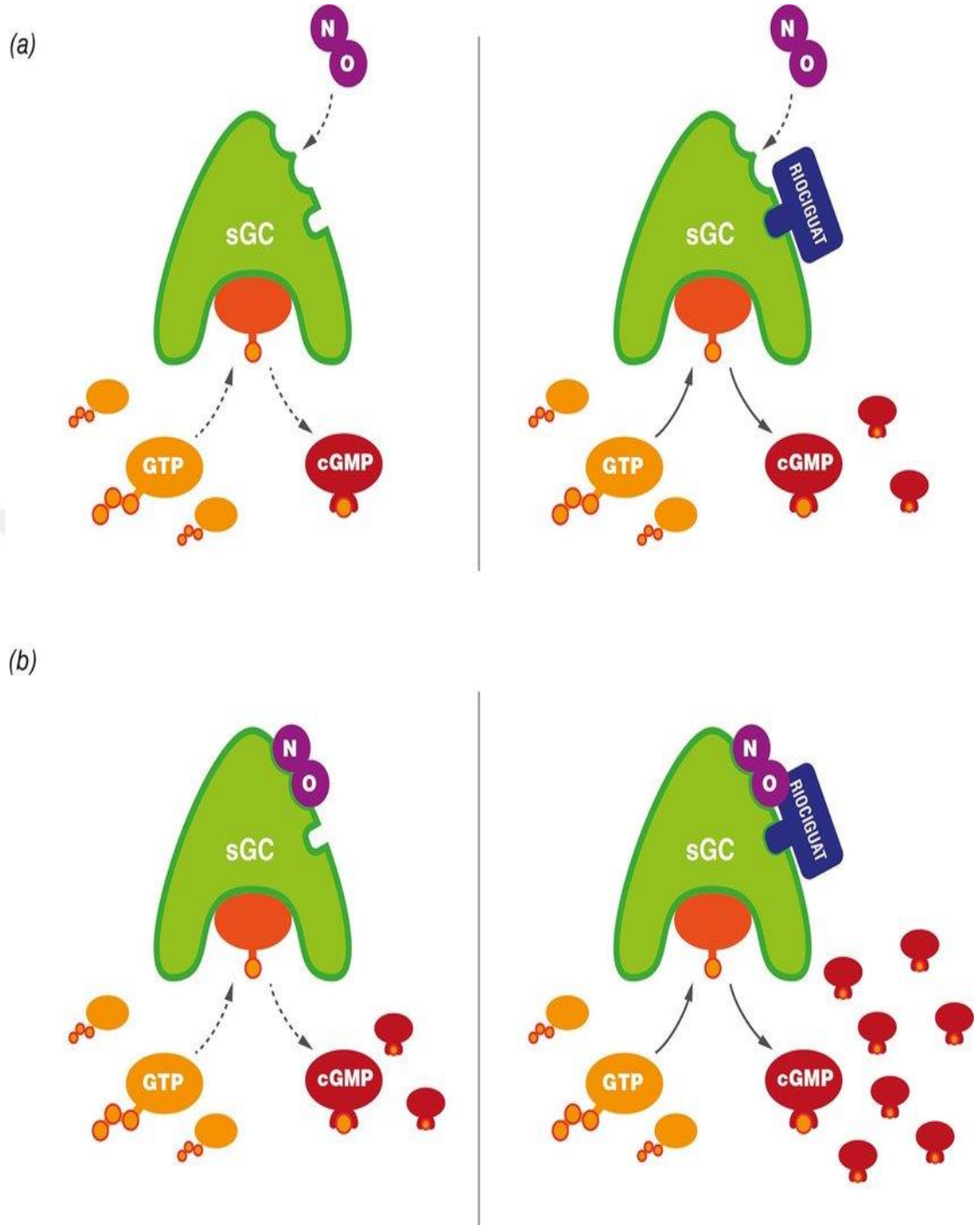
kaspazları inhibe ederek anti inflamatuvar etki gösterdiği görülmüştür(99). Resveratrol inflamasyonda TLR-4 / MyD88 / NF-pathB sinyal yolunu da inhibe eder. İdeal resveratrol dozunu belirlemek için birçok in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Yüksek doz resveratrol verilen fareler (1800 mg / kg) 3-4 ay içinde ölmüşlerdir (100). İnsanlarda günde 5 gr a kadar resveratrolün güvenli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(101). Ancak bu çalışmalar sağlıklı populasyonda yapıldığı için ideal doz için çalışmalar sürmektedir. Ayrıca oral yoldan verilen resveratrolün bağırsak florası tarafından metabolize edilmesi hangi etkilerin resveratrole ait olduğu hangi etkilerin metabolitlerine ait olduğu belirsizdir. Bu nedenle en uygun uygulama yolunu da bulmak gerekmektedir.

2.6.2. Riociguat

Riociguat, vasküler düz kasların gevşemesine neden olan bir guanilat siklaz stimulatörüdür. IUPAC adı metil *N*- [4,6-diamino-2- [1 - [(2-florofenil) metil] pirazolo [3,4-b] piridin-3-yl] pirimidin-5-yl] - *N*- metilkarbamat olup moleküler formülü C₂₀ H₁₉ F N₈ O₂'dir (Şekil 5). 422,4 g / mol ağırlığında olup yarılanma ömrü hastalarda 12 saat sağlıklı kişilerde 7 saattir. Mutlak biyoyaralanım %94 tür. Oral alındıktan sonra pik seviyesin yaklaşık 1.5 saat sonra ulaşır. Gıdalar riociguatın emilimini etkilemez. %40 idrarla %53 gaitayla atılır. Albümin ve alfa-1-asidik glikoproteine %95 oranında bağlanır.



Şekil 5. Riociguat kimyasal yapısı



Şekil 6. Riociguat etki mekanizması

NO, reseptörü olan çözünür guanilat siklazı (sGC) aktive eder. NO, sGC a bağlanıp siklik guanozin monofosfatın (cGMP) sentezini katalizler. cGMP, vasküler tonusu, proliferasyonu, fibrozisi ve enfalamasyonu etkileyen süreçlerin düzenlenmesinde rol alır. Riociguat, sGC'yi NO'ya duyarlı hale getirirken(Şekil 6a)

aynı zamanda NO'ten bağımsız bir şekilde sGC'yi doğrudan uyarır(Şekil 6b). Riociguat NO-sGC- cGMP yolunu uyarır ve vazodilatasyonla birlikte c GMPyi artırır.

Riociguatın MI'da kardiyak enfarkt alanını azaltıp azaltmadığına dair çalışmalar yapılmıştır. Sol koroner arter ligasyonu ile 30 dakika iskemik bırakıldı. Daha sonra reperfüzyondan 5 dakika önce ve 5 dakika sonra riociguat (1.2 umol / l) ve plasebo verildi. 24 saat sonra enfarkt alanları MRG ve PET ile değerlendirildi. Riociguatla tedavi edilen farelerde enfarkt alanının küçüldüğü görülmüştür(102).

Riociguatın etkinliğinde cinsiyetler arasında anlamlı bir fark yoktur. Yaşla birlikte riociguatın yararlanma ömründe artış olmasına rağmen genç ve yaşlı popülasyonlarda iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Sigara içenlerde riociguatın metabolizma hızı artmaktadır. Bu da riociguatın etkinliğini azaltmaktadır(103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyel çalışmamızı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmamızı gerçekleştirdik. Çalışmamızı Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma Ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirdik.

Çalışmamızda rastgele seçilmiş yaklaşık 250-300 gr ağırlığında 35 adet Wistar albino cinsi dişi ratlar kullanıldı. Deney süresi boyunca ratlar ideal laboratuvar koşullarında (sessiz ortam, %50-60 nem ortamında, 22-24 derece sıcaklıkta) takip edildi. 12 saat gündüz 12 saat karanlık döngüsü uygulandı ve standart yem ile beslendiler. İdeal ölçülerdeki kafeslerde tek başlarına takip edilen ratların kafesleri düzenli aralıklarla temizlendi.

1 haftalık grup içi adaptasyonları takiben ratlar rastgele seçilip 7'li 5 grup oluşturuldu.

3.1. Deney Grupları

Grup 1 (Kontrol grubu, n=7) : Herhangi bir işlem yapılmayan grup

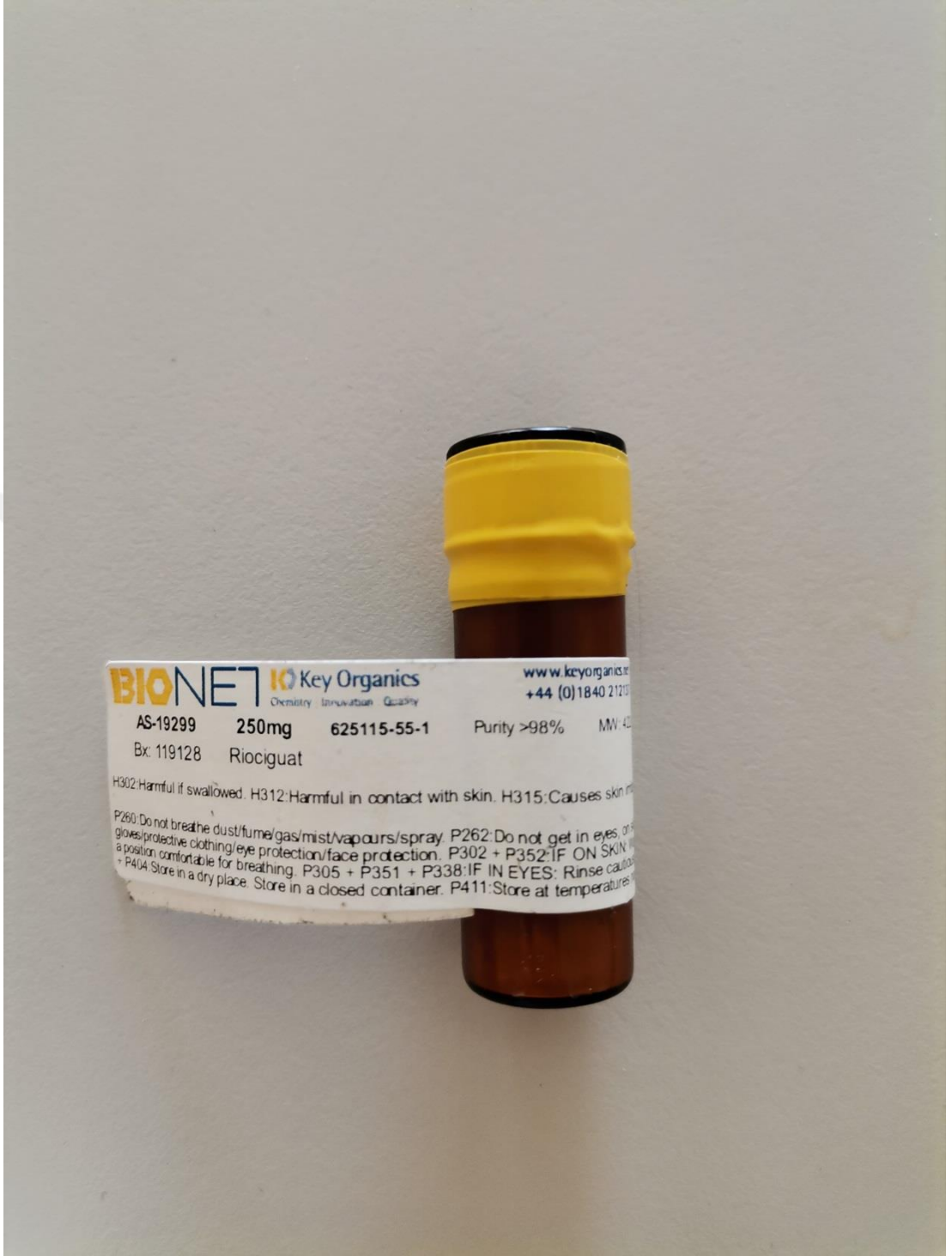
Grup 2 (İskemi grubu, n=7) : İskemiden sonra ilaç verilmeyen grup

Grup 3 (İskemi + Riociguat grubu, n=7) : İskemi oluşturulduktan sonra reperfüzyondan hemen önce ve reperfüzyondan sonra 2 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda riociguat (i.p.) verilen grup

Grup 4 (İskemi + Resveratrol grubu, n=7) : İskemi oluşturulduktan sonra reperfüzyondan önce ve reperfüzyondan sonraki 2 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda resveratrol (p.o.) verilen grup

Grup 5 (İskemi + Resveratrol + Riociguat grubu, n=7) : İskemiden sonra reperfüzyondan önce ve reperfüzyon sonrası 2 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda resveratrol (p.o.) ve 10 mg/kg/gün dozunda riociguat (i.p.) kombine tedavi verildi.





Resim 1. Çalışmamızda kullandığımız riociguat



Resim 2. Çalışmamızda kullandığımız resveratrol

3.2. Anestezi

İşlem öncesi en az 4 saat oral alımları durdurulan ratlara 80 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) + 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ile anestezi uygulandı. Anesteziden sonra 50 mg/kg dozunda sefazolin (i.m.) yapıldı. Ayrıca 5 cc salin intraperitoneal olarak enjekte edildi.

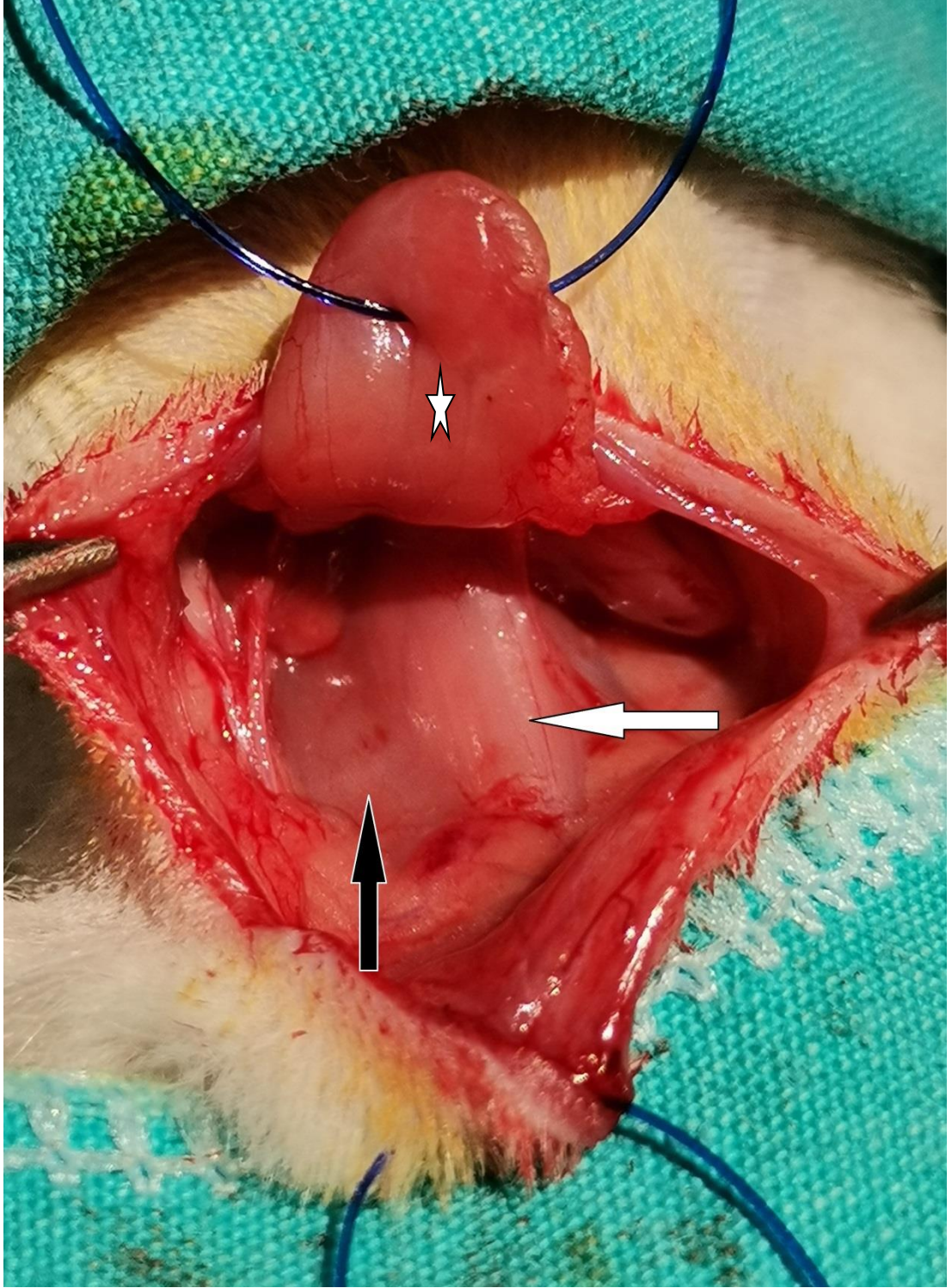
3.3. Cerrahi İşlem

Cerrahi işleme başlamadan önce ratların boyun kısmı traş edildi. İşlemden önce ve cerrahi kapatmadan sonra cerrahi alan %10'luk povidone iodine (Batticon®; Adeka, Samsun, Türkiye) ile temizlendikten sonra steril gazlı bezle cerrahi alan silindi. Cerrahi alan boyandıktan sonra steril delikli yeşille örtüldü (Resim 3).



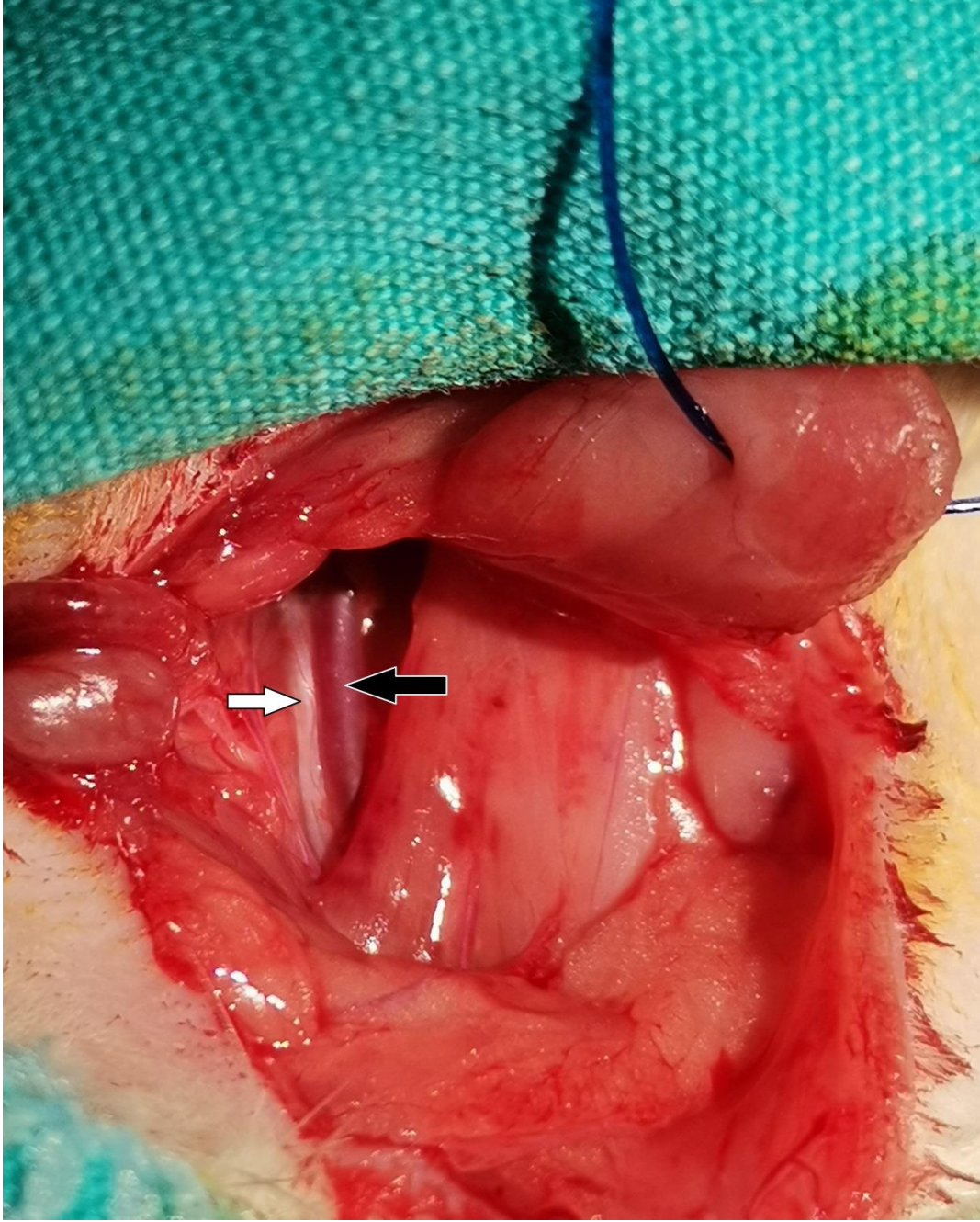
Resim 3. Alanın batikonla boyandıktan sonra izotonikle yıkanması ve steril yeşille örtülmesi. Horizontal cilt insizyonu

Horizontal insizyonla cilt, cilt altı dokusu geçildikten sonra yüzeysel fasya dokusu geçildi. Yüzeysel fasya geçildikten sonra glandüler doku ve sternohyoid, digastrik, sternomastoid kaslar ortaya çıkarıldı (Resim 4).



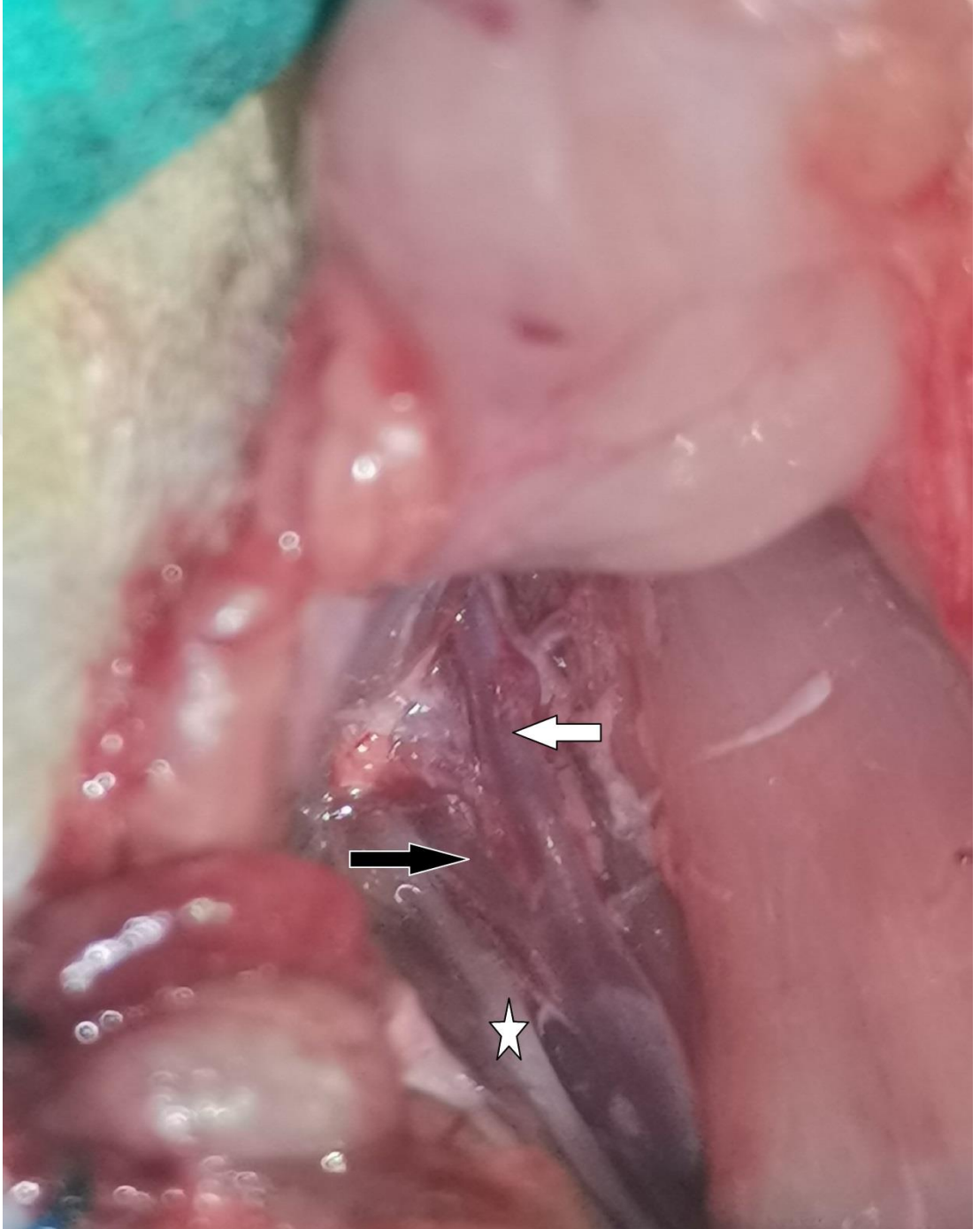
Resim 4. Yıldız: glandüler doku siyah ok: sternohyoid kas beyaz ok : sternomastoid kas

Künt disseksiyonla damar-sinir paketine ulaşıldı. Burada karotis kommunis ve nervus vagus ortaya konuldu (Resim 5).



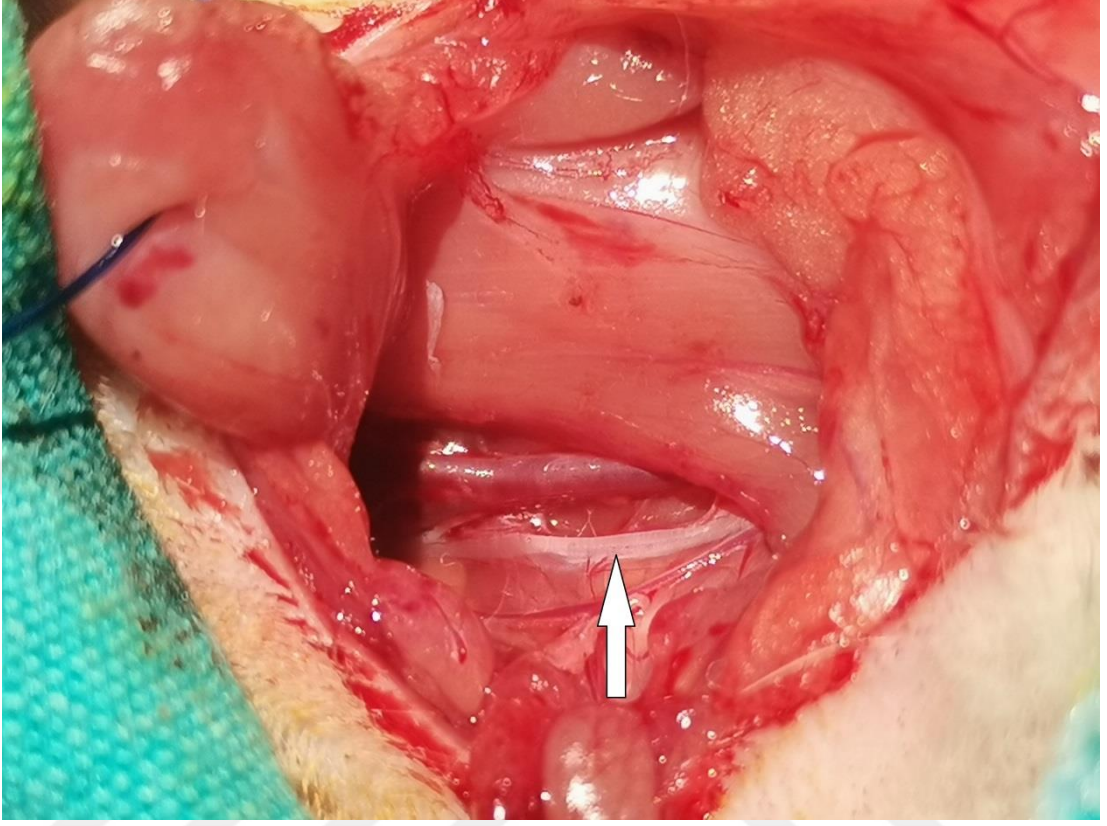
Resim 5. beyaz ok: nervus vagus siyah ok: karotis kommunis

Karotis kommunis takip edilerek bifurkasyona ulaşıldı ve internal ve external karotid arterler ortaya konuldu (Resim 6).



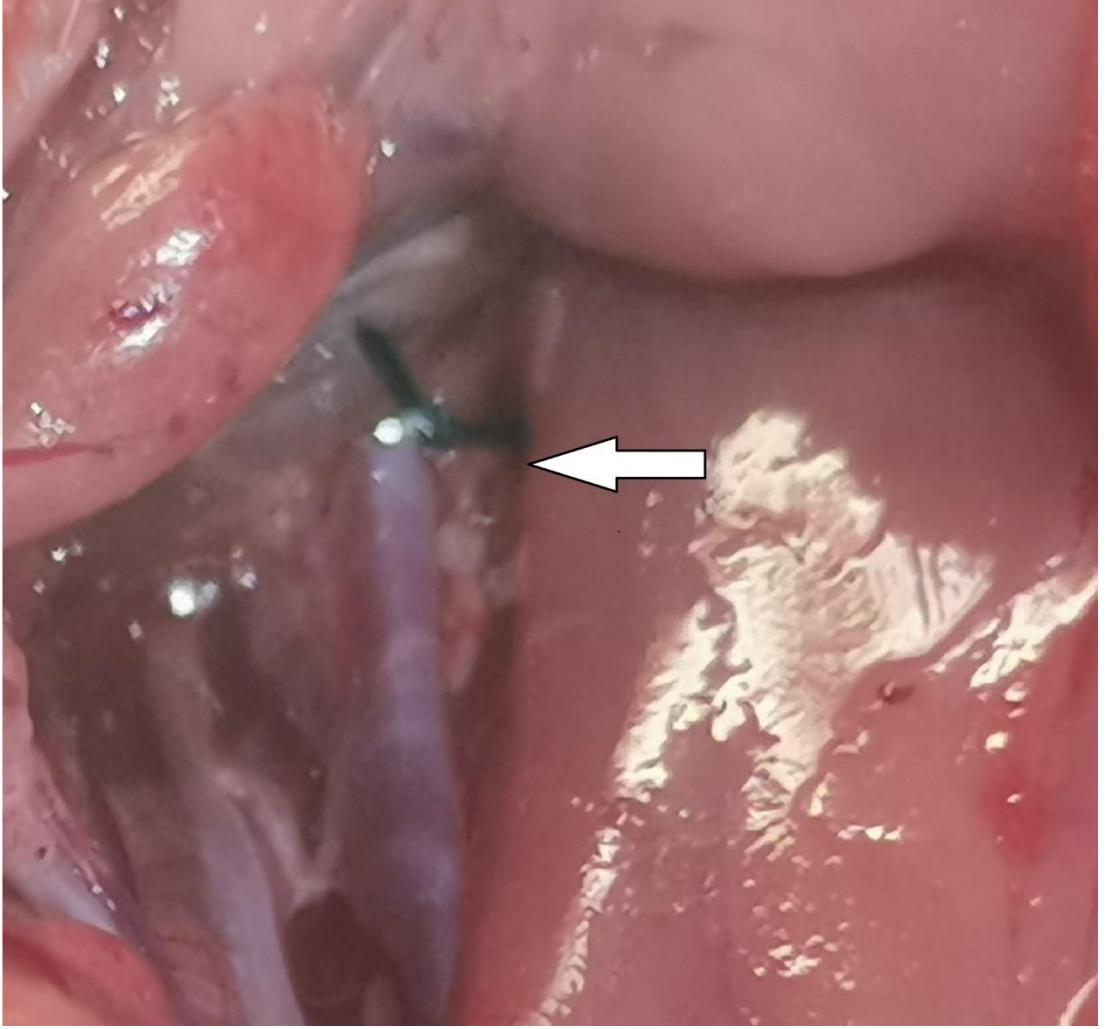
Resim 6. karotis kommunis takip edilerek karotis externa ve intern ortaya konuldu.
yıldız: nervus vagus **siyah ok :** karotis interna **beyaz ok :** karotis externa

Nervus vagus keskin disseksiyonla karotis kommunisten disseke edildi (Resim 7).



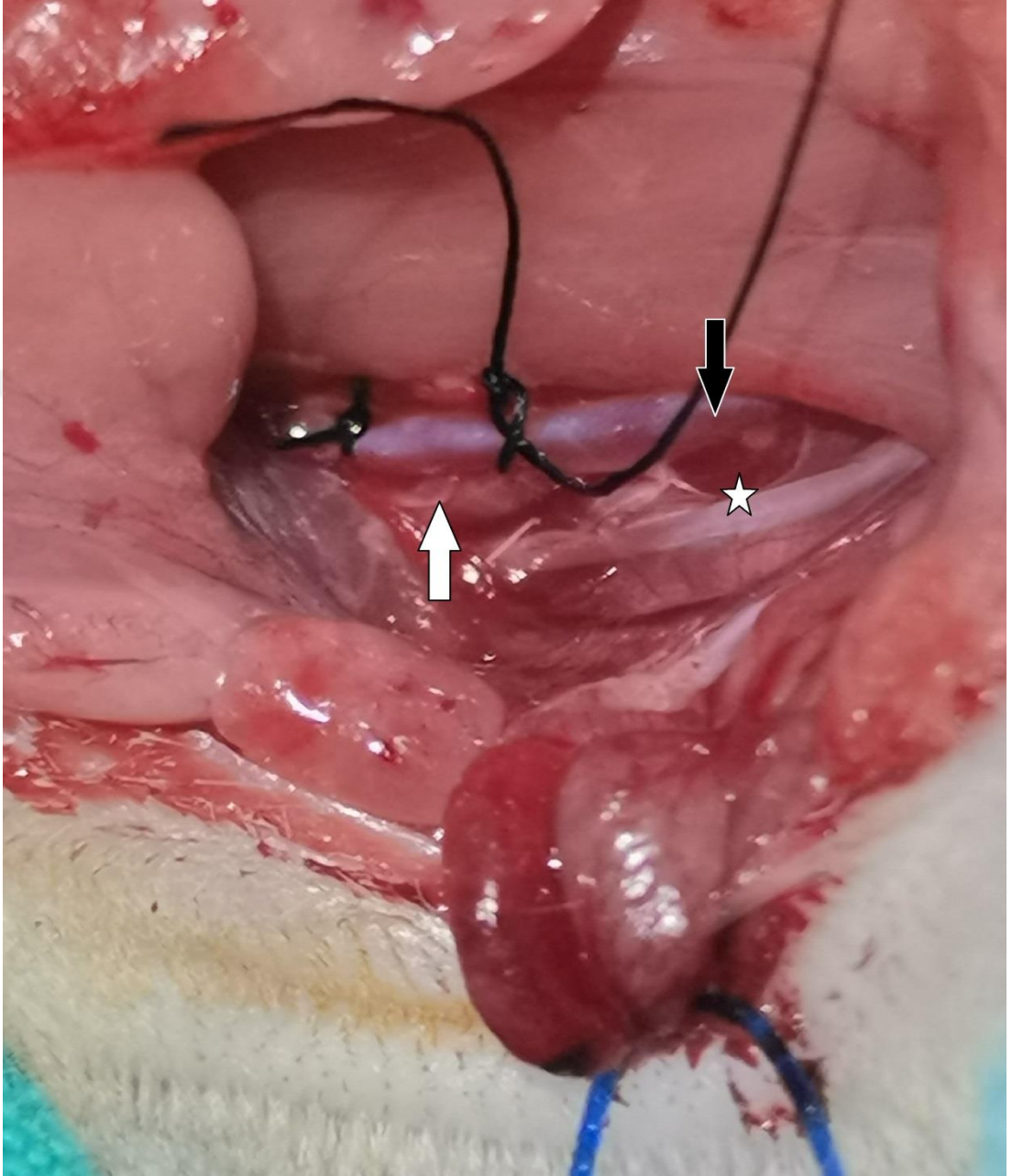
Resim 7. beyaz ok : nervus vagus

External karotid karter distalde 5-0 ipek sturla sıkı bir şekilde bağlandı (Resim 8).



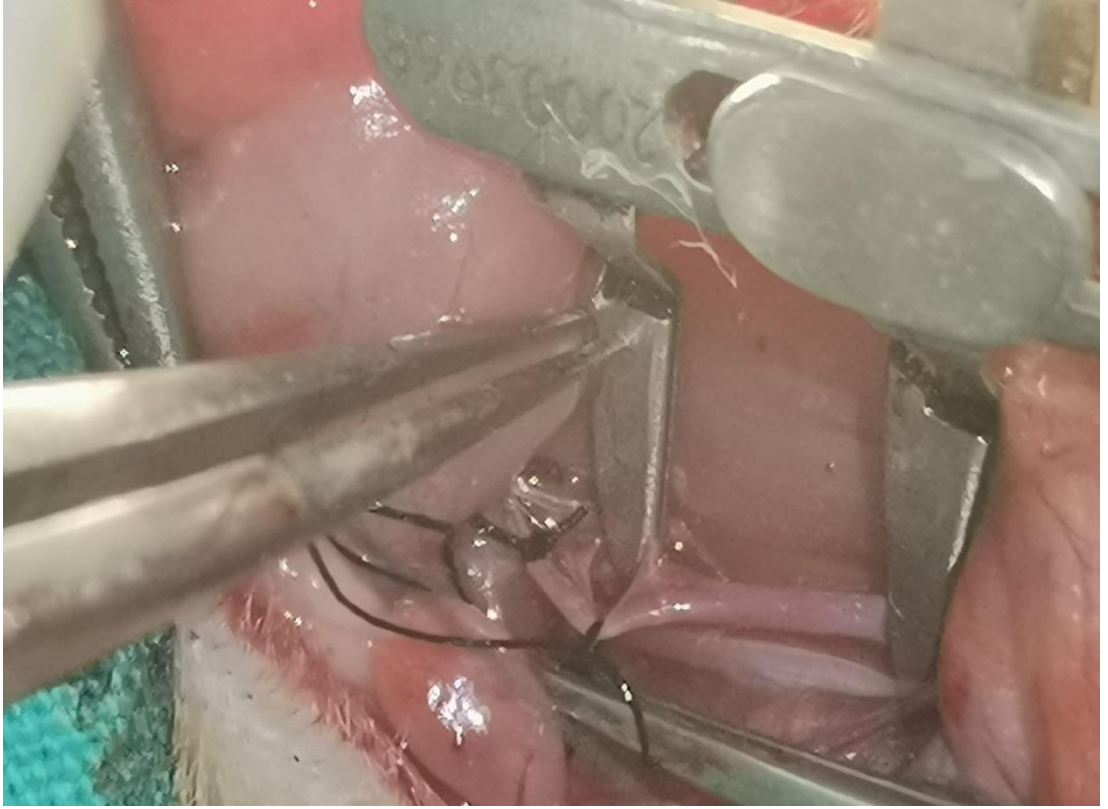
Resim 8. External karotid arterin distalden sıkıca bağlanması

Diğer suture ise external karotid arterin karotis kommunisten dallandığı yere yakın bir şekilde gevşek olarak bağlandı (Resim 9).



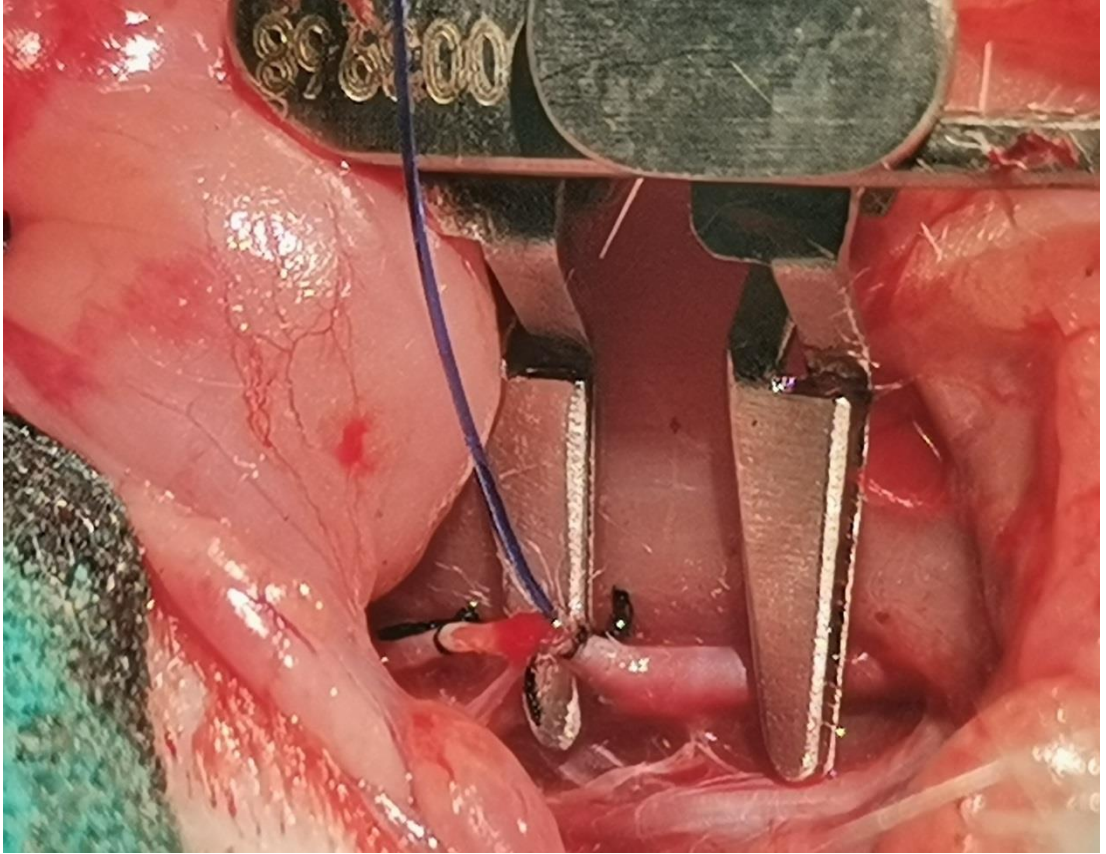
Resim 9. External karotid arterin bifurkasyona yakın yerden gevşek bağlanması.
yıldız : nervus vagus **siyah ok :** karotis kommunis **beyaz ok :** karotis interna

Karotis kommunis ve internal karotid arter geçici klipsler yardımıyla geçici olarak kapatıldı (Resim 10).



Resim 10. Karotis kommunis ve karotis internanın klipslerle geçici olarak kapatılması

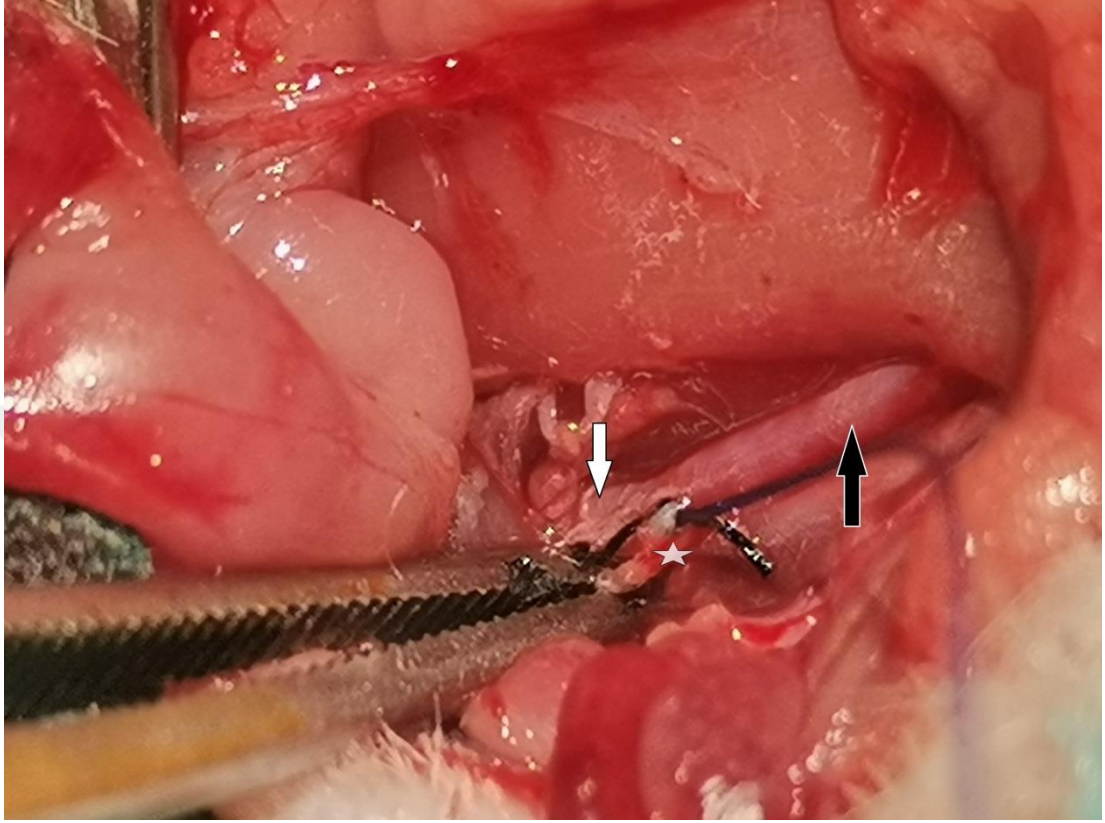
External karotid arterlereki süturlar arasında arteriotomi yapıldı. Buradan ucu genişletilmiş 3-0 monoproten sütur geçirildi ve sütur karotis kommunise kadar ilerletildi(Resim11).



Resim 11. Arteriotomi yapılan external karotid arterden stutum ilerletilmesi

Sütur karotis kommunise ilerletildikten sonra gevşek bırakılan sütur sıkıca bağlandı.

Karotis kommunise ilerletilen sütür manevrayla internal karotid artere doğru yönlendirildi ve klipsler çıkarıldıktan sonra sütür internal karotis içinde ilerletildi(Resim12).



Resim 12. siyah ok: karotis kommunis **beyaz ok:** karotis interna **yıldız :** external karotidten sütürün internal karotide doğru yönlendirilmesi

Suturda direnç hissedilene kadar ilerletildi. 2 saat boyunca sütür internal karotid arterde bekletilip MCA oklüzyonu sağlamış olduk. Tabakalar usulüne uygun bir şekilde 3-0 ipek sütürle kapatıldı (resim 13).



Resim 13. Tabakaların üsülüne uygun kapatılması

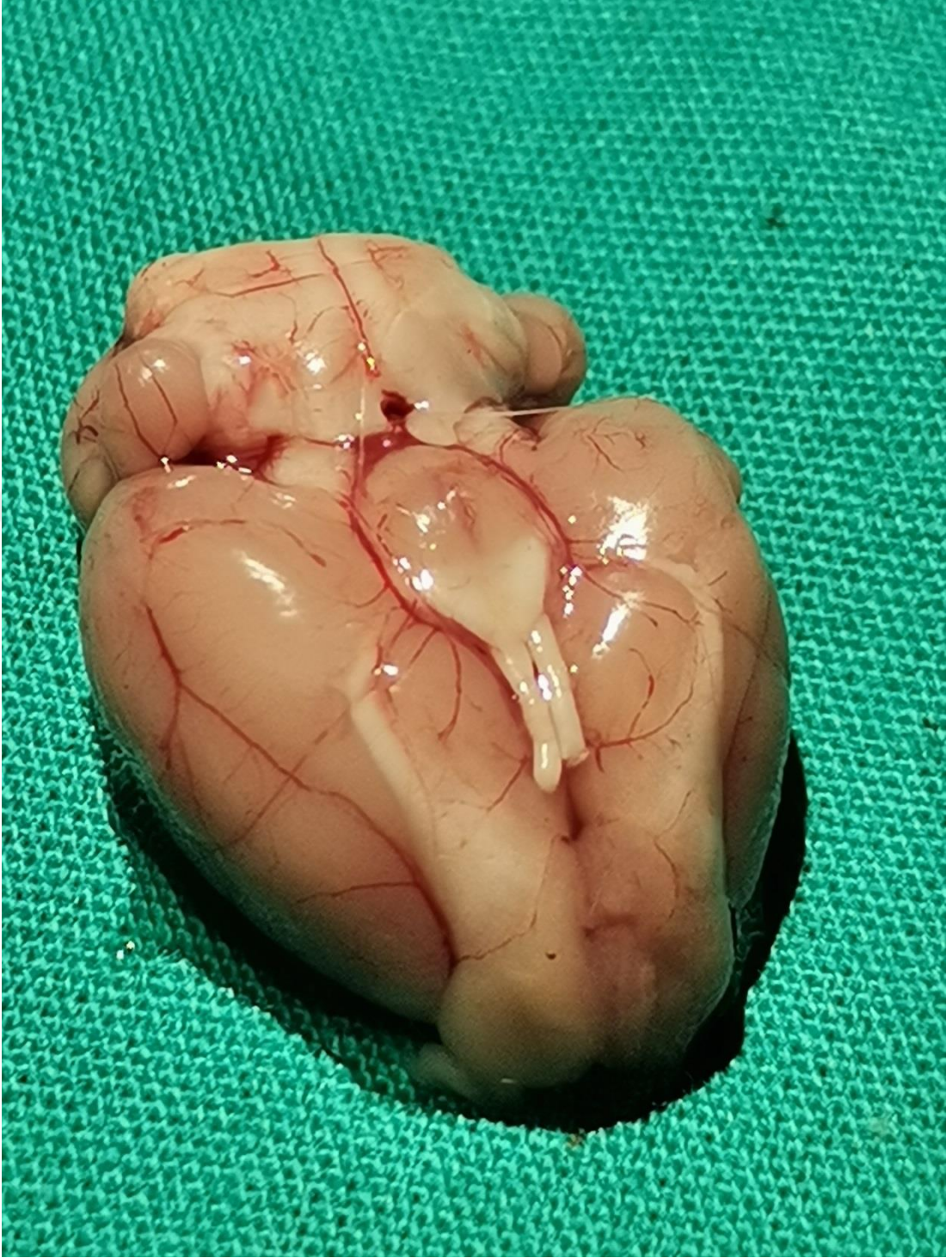
Cerrahi alan batikonla temizlendi. 2 saat sonunda suture geri çekilerek reperfüzyon sağlandı.

3.4. Sakrifikasyon

Cerrahi işlemden 48 sonra tedavileri tamamlanan gruplarla (grup 3,4,5) kontrol (grup 1) ve iskemi (grup 2) gruplarının sakrifikasyon işlemine geçildi. Genel anestezi uygulanan ratlara (80 mg/kg ketamin hidroklorid + 10 mg/kg ksilazin hidroklorid) sakrifikasyon işleminden önce sol ventriküllerinden kan alındı. Daha sonra boyun kasları disseke edilerek foramen magnuma girildi. Buradan keskin makasla kafatası orta hattan oksipitalden frontale doğru kesildi. Mikrodissektör ve mikromakas yardımıyla beyin dokusu kraiyumdan çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokusu orta hattan ikiye bölündü. İskemi oluşturduğumuz sağ hemisferler %10 'luk formaldehit içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi.



Resim 15. Rat beyninin yandan görüntüsü



Resim 16. Rat beyninin bazal görüntüsü

3.5. Histopatolojik Değerlendirmeler

Sakrifiye edilen hayvanların beyin dokuları 24 saat süreyle formol fiksasyonuna tabi tutuldu. Dokular daha sonra çeşme suyu altında 12 saat süreyle yıkandı ve 70%'lik alkole alındı. Bu alkol içerisinde 24 saat bekleyen örnekler daha sonra sırasıyla 80%-90%-96%-100%'lük alkol serilerinde 1'er saat süreyle dehidre edildi. Suyu uzaklaştırılan doku örnekleri Xylol içerisinde alındı ve şeffaflandırma işlemi gerçekleştirildi. Şeffaflandırma işlemi yapılan örnekler 1:1 oranında hazırlanan Xylol ve erimiş parafin çözeltisinde 56 °C'lik inkübatörde 1 saat süreyle parafin infiltrasyonuna tabi tutuldu. Xylol ve erimiş parafin çözeltisinden alınan örnekler temiz erimiş parafin içerisinde 2 saat daha 56 °C'lik inkübatör içerisinde parafin nüfuzuna maruz bırakıldı. Daha sonra doku örnekleri doku gömme bloklarının içerisine temiz erimiş parafinlere gömüldü ve doku bloklama işlemi tamamlandı. Blokajı gerçekleştirilen doku örnekleri kesitlerin alınmasına kadar kuru bir ortamda ve oda ısısında muhafaza edildi.

Bloklara gömülen beyin doku örneklerinden Shandon – Finesse E+ (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) model yarı otomatik mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Alınan örneklerin bir kısmı rutin histopatolojik boyama bir kısmı da immunohistokimyasal boyamalar için ayrıldı. Rutin histopatolojik boyama yapılan örnekler ısıtma tablası üzerinde parafin depolimerizasyonuna tabi tutuldu. Parafin depolimerize olan örnekler soğumadan iki seri Xylol içerisinde 15'er dakika süreyle bekletildi. Deparafinize olan örnekler azalan alkol serilerinde (100%-100%-96%-90%-80%-70%) 5'er dakika süreyle dehidre edildi ve distile suya getirildi. Distile suda yıkanan kesitler daha sonra harris hematoksilen solüsyonuna alındı ve 8 dakika süreyle boyama işlemi gerçekleştirildi. Çeşme suyunun altında artık boyalardan arındırılan örnekler 1 dakika süreyle Eozin boyası ile boyandı. Boyama işlemi tamamlanan kesitler düşük alkol serilerinden (70%-80%-90%) daldırıp çıkartılarak hızlı bir şekilde fazlalık eozin uzaklaştırıldı. Yüksek alkol serilerinde (96% ve 100%) 5'er dakika bekletilen kesitler iki seri Xylol'de 15'er dakika bekletildi ve entellan ile kapatıldı. Kapatma işlemi gerçekleştirilen örnekler kamera ataçmanlı Zeiss ışık mikroskobu (Carl Zeiss

Microscopy, GmbH, Almanya) altında incelendi ve mikrograflar alındı. Aynı bloklardan alınan diğer kesitlere ise Bax ve Bcl-2 immunohistokimya uygulandı.

3.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Parafin bloklara gömülen beyin örneklerinden 5 µm kalınlığındaki kesitler 2 seri Xylole içerisinde 15'er dakika süreyle deparafinize edildi. Azalan alkol serilerinde (100%-100%-96%-90%-80%-70%) 5'er dakika süreyle dehidre edildi ve distile suya getirildi. Distile suda 10 dakika yıkanan örnekler immunohistokimya için PBS'e aktarıldı. İki seri PBS'te 5'er dakika süreyle yıkanan örnekler antijen retrieval amacıyla taze sitrat tamponu (Ph 6.0) içerisinde kaynama altı dereceye kadar ısıtıldı. Antijenlerin açılması sonrası oda ısısına getirilen örnekler tekrar iki seri PBS içerisinde 5'er dakika süreyle yıkandı. Kesitlerde yer alan dokularda endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi için örnekler metanolde hazırlanan 3 %'lük H₂O₂ içerisinde 15 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra örnekler tekrar iki seri PBS'te 5'er dakika süreyle yıkandı. Örneklerin etrafı hidrofobik Pap-Pen ile çizildi ve üzerine non spesifik bağlanmayı bloke etme amacıyla Ultra V Block (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD. cat no: TA-125-UB) damlatıldı ve oda ısısında 7 dakika süreyle inkübasyon sağlandı. Daha sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve PBS içerisinde 1:250 sulandırılan Bax (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, ABD. cat no: sc-7480) ve Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, ABD. cat no: sc-7382) antikorumları damlatıldı. Antikor damlatılan örnekler + 4°C' de overnight inkübasyona alındı. Ertesi gün örnekler iki seri PBS içerisinde 5'er dakika süreyle yıkandı. Yıkanan örneklerin üzerine Biotinylated Goat Anti-Polyvalent solüsyonu (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD. cat no: TP-125-BN) damlatıldı ve 15 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. Tekrar iki seri PBS içerisinde 5'er dakika süreyle yıkanana örneklerin üzerine Streptavidin peroxidase solüsyonu (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD. cat no: TS-125-HR) damlatıldı ve oda ısısında 15 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. Streptavidin inkübasyonu sonrası örnekler iki seri PBS'te 5'er dakika süreyle yıkandı ve sinyal oluşması için örnekler 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromojen ile inkübe

edildi. Sinyal gelişimi kullanıma hazır bir kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD. cat no: TA-125-HD) ile gerçekleştirildi. Reaksiyon mikroskop altında izlendi ve pozitiflik elde edildiğinde PBS'te yıkanarak reaksiyon durduruldu. Daha sonra örnekler hematoksilin ile zıt boyama yapıldı, artan alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi ve iki seri Xyol'de 15'er dakika bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Elde edilen immunohistokimya örnekleri kamera ataçmanlı mikroskop altında incelendi ve mikrograflar alındı.

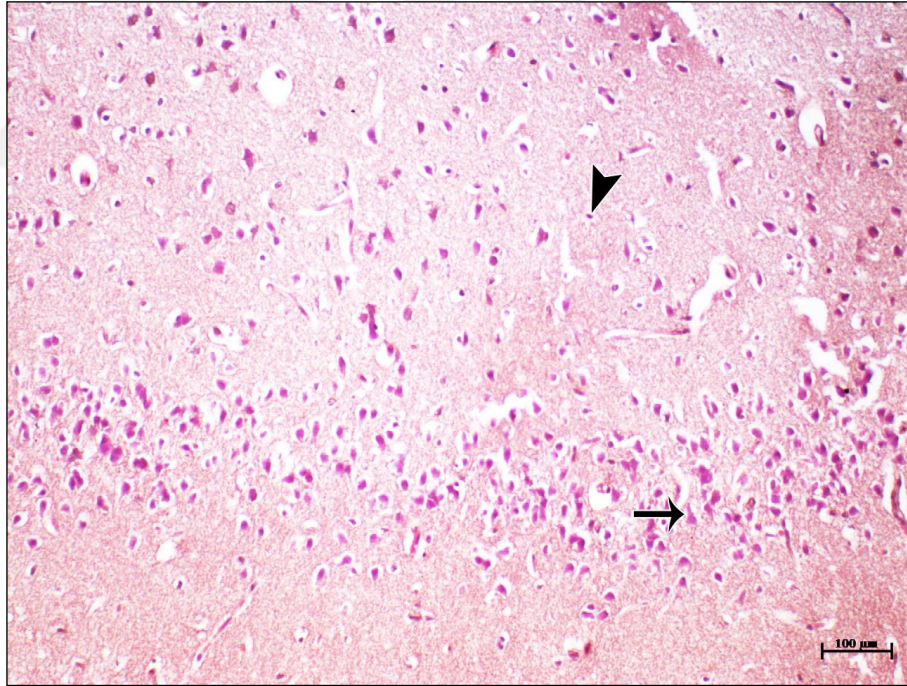
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Değerlendirmeler

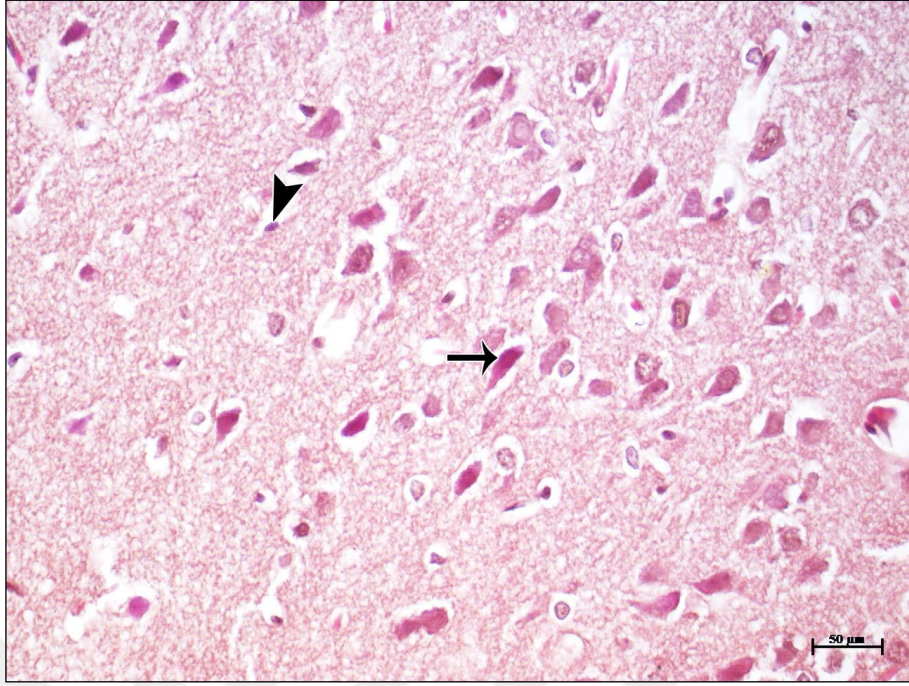
4.1.1. Hematoksilin&Eosin Bulguları

Kontrol grubunda beyin dokusunun normal yapıda olduğu izlendi. Beynin dış yüzünde meninkslerin normal özellikte ve yer yer araknoidle beraber beyni besleyen büyük çaplı damarların varlığı tespit edildi. Nöronların, nörogliaların beyin dokusunda diffüz şekilde dağıldığı ve beyin dokusunda yer alan kapillerlerin normal şekilde olduğu tespit edildi (**Resim 17 & 18**). Deney grubunda beyin dokusunda diffüz ve fokal hemoraji alanlarının bulunduğu ve kan-beyin bariyerinin ortadan kalktığı görüldü. Bu grupta beyin dokusunda geniş yıkım alanlarının yanı sıra, nöronlarda piknotik çekirdeklerin yoğun miktarda varlığı tespit edildi. Nöroglialarda nöronlara benzer şekilde piknozise uğramaktaydı ve bazı sinir hücrelerinde perinöral ödem varlığı izlendi. Damarların çok büyük bir kısmının kontraktıl durumda olduğu ve lümenlerinde konjesyonun varlığı tespit edildi (**Resim 19 & 20**). Resveratrol grubunda yer yer fokal hemoraji alanlarının varlığı tespit edilse de bu kanama alanları deney grubundaki kadar diffüz durumda değildi. Bu grupta yine deney grubuna benzer şekilde kısmen ödem, nöronlarda ve glia hücrelerinde piknozis, serebral kapillerlerde kontraksiyon ve konjesyon izlendi. Her ne kadar doku bazında deney grubuna kısmen benzer özellikler görünse de beyin doku hücrelerini ele aldığımız zaman bu gruptaki nöronların ve nörogliaların daha sağlıklı mikroskopik bir yapıda olduğu ve patolojik özelliklerin kısmen ortadan kalktığını izledik (**Resim**

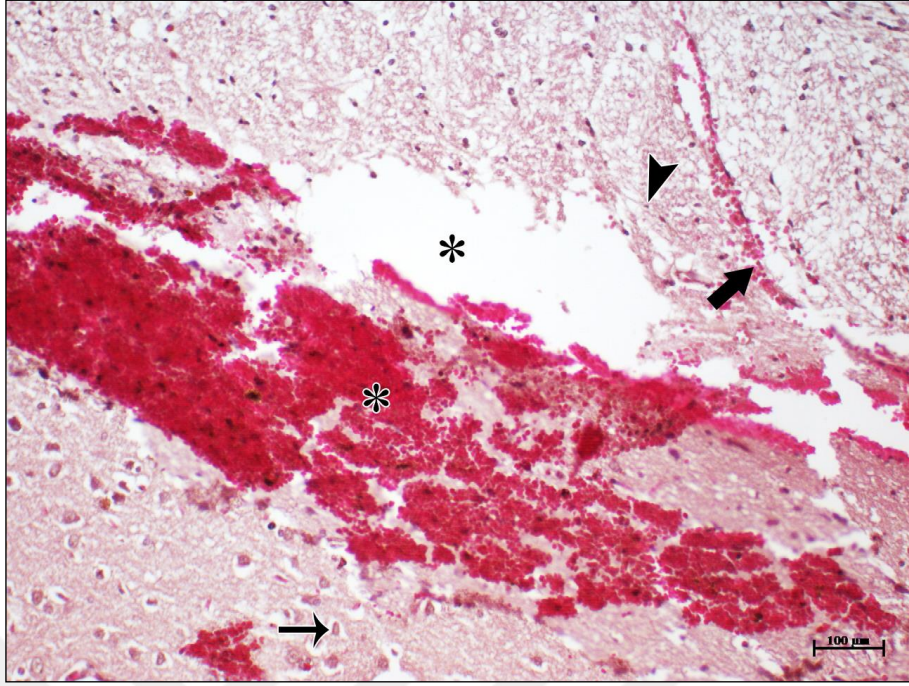
21 & 22). Riociguat grubunda mikroskopik incelemede beyin dokusunda hemorajinin tamamen ortadan kalktığı ancak yer yer piknotik çekirdekli nöron ve nörogliaların varlığı görüldü. Bu gruptaki kapillerler deney ve resveratrol grubuna göre daha dilate görünümdeydi. Damarlarda konjesyona rastlanmadı ancak beyin dokusunun genelinde kısmi olarak perivasküler ödemli oluşumların bulunduğu tespit edildi (**Resim 23 & 24**). Resveratrol ve riociguat kombine tedavisi uyguladığımız grupta herhangi bir hemorajik olgu görülmedi, ayrıca beyin damarlarının yine bu gruba benzer şekilde dilate olduğu gözle çarpıyordu. Piknotik çekirdekli nöron ve nörogliaların dağılımında gözle görülür bir azalma tespit edildi. Perivasküler veya perinöral ödemin tamamen ortadan kalktığı görüldü (**Resim 25 & 26**).



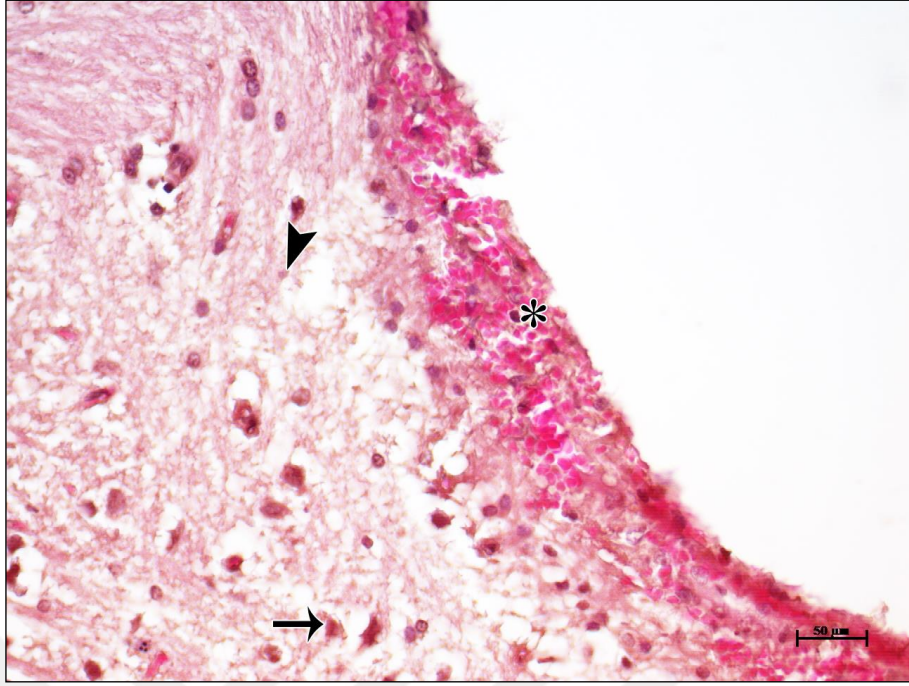
Resim 17: Kontrol grubu beyin kesitlerinin küçük büyütmedeki görünümü. Nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) normal görünüm. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 100 µm.



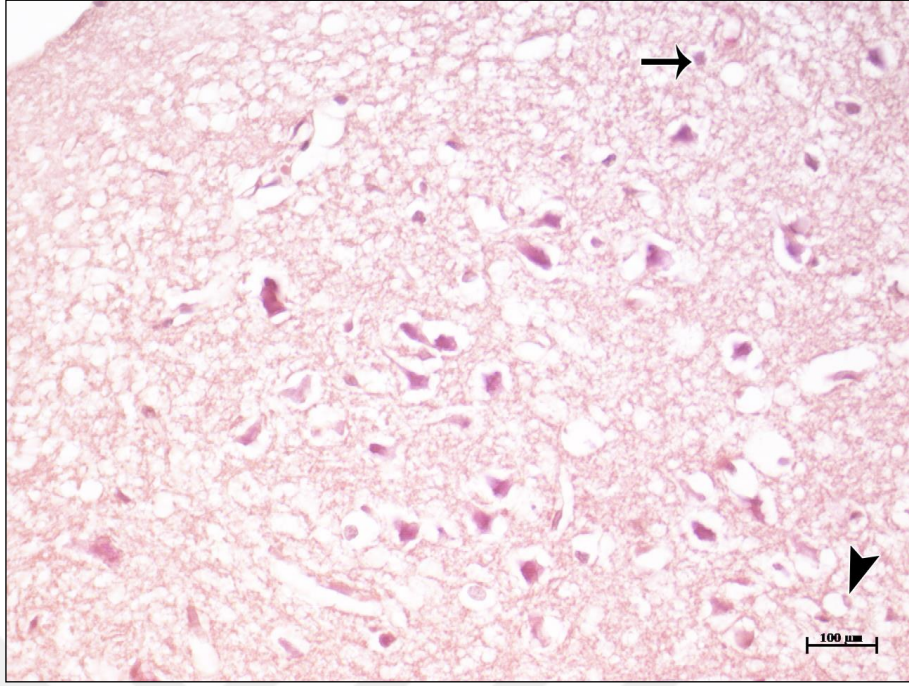
Resim 18: Kontrol grubu beyin kesitlerinin büyük büyütmedeki görünümü. Nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) normal görünüm. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 50 μ m.



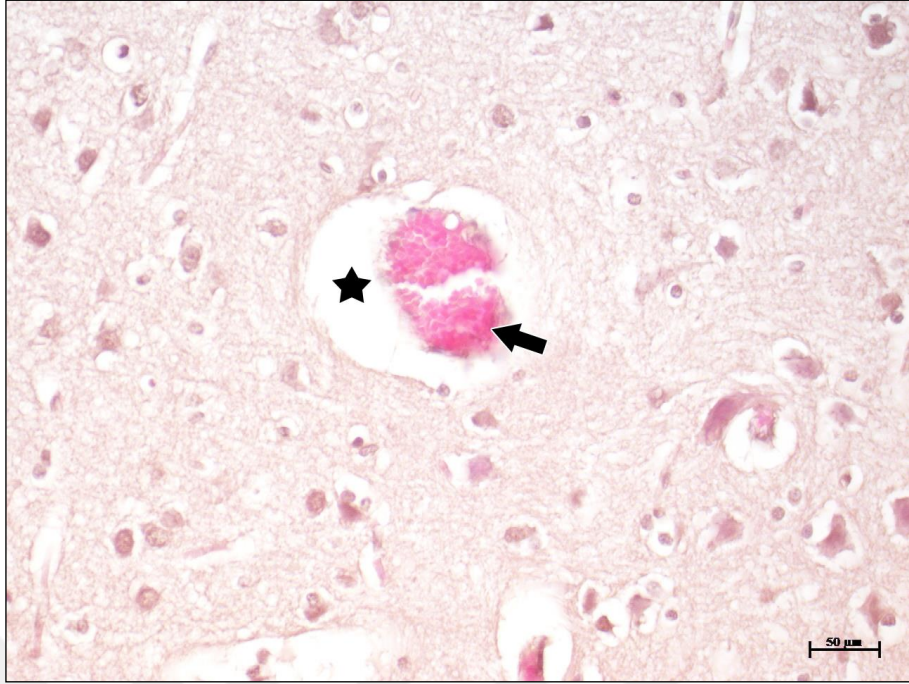
Resim 19: Deney grubu beyin kesitlerinin küçük büyütmedeki görünümü. Beyin dokusunda yıkım ve yoğun hemoraji (*), nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) piknotik nükleus, serebral kapillerlerin longitudinal kesitlerinde konjesyon görüntüsü (**kalin ok**). **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 100 µm.



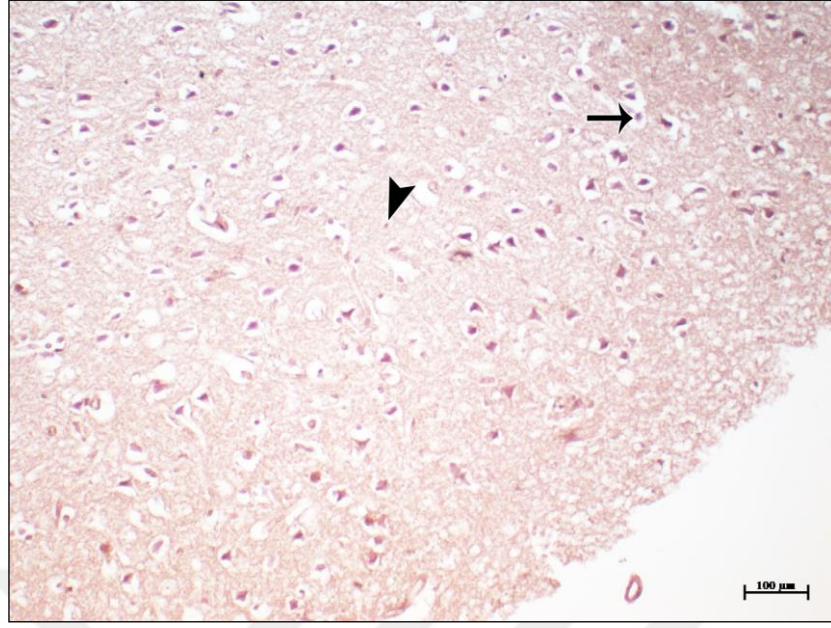
Resim 20: Deney grubu beyin kesitlerinin büyük büyütmedeki görünümü. Nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) piknotik nükleus, beyin ventriküler alanda diffüz konjesyon (**yıldız**). **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 50 µm.



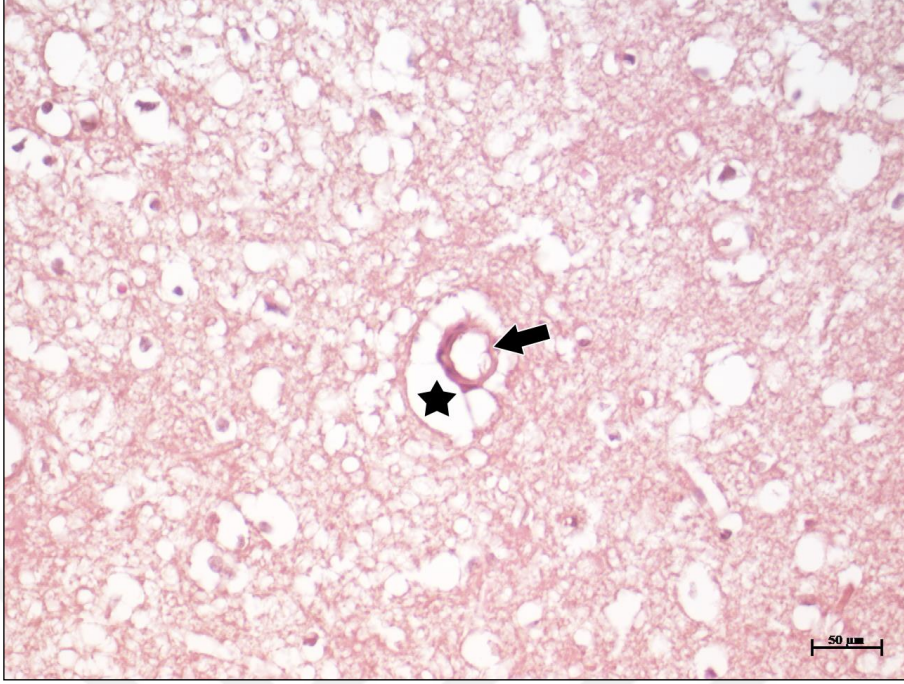
Resim 21: Resveratrol grubu beyin kesitlerinin küçük büyütmedeki görünümü. Beyin kesitlerinde nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) yer yer piknotik çekirdekli görünüm. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 100 µm.



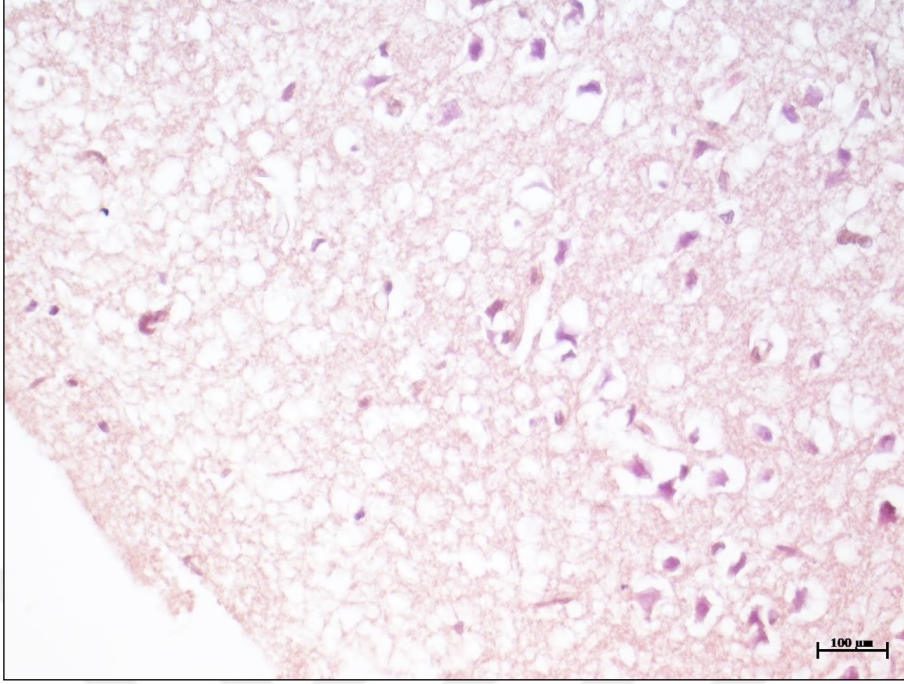
Resim 22: Resveratrol grubu beyin kesitlerinin büyük büyütmedeki görünümü. Resveratrol grubu beyin kesitlerinde büyük bir çoğunluğu kontraktıl durumdaki kapillerlerin yanı sıra yer yer görülen dilate serebral kapiller görüntüsü (**kahın ok**), perivasküler ödem (★) varlığını sürdürmektedir. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 50 µm.



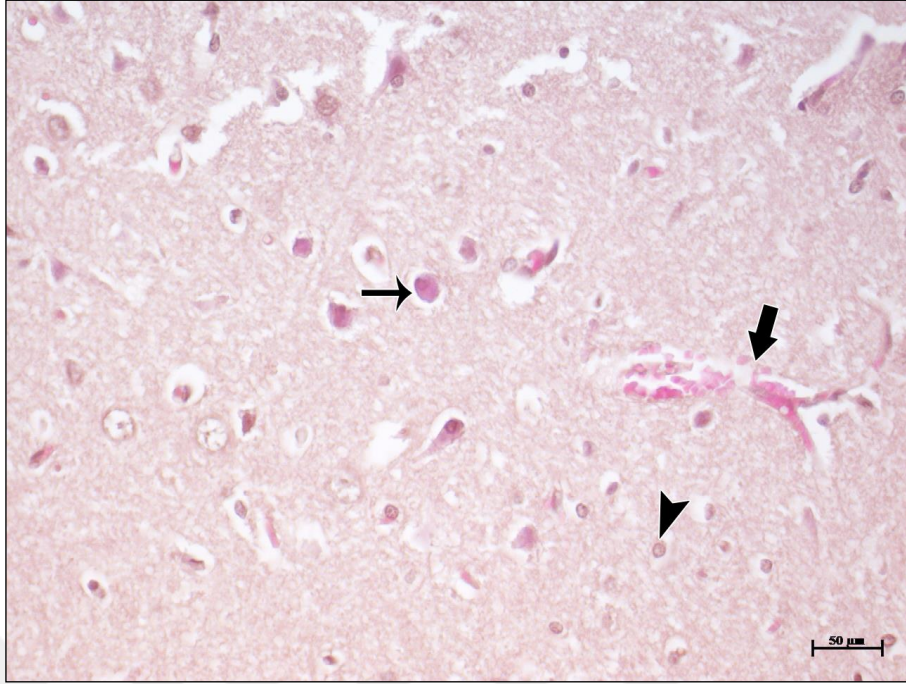
Resim 23: Riociguat grubu beyin kesitlerinin küçük büyütmedeki görünümü. Riociguat grubun beyin kesitinin kontrol grubuna benzer özellikte normal görünümde nöronların yanı sıra bazı nöron (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) piknotik çekirdekli hücre durumu. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 100 μm.



Resim 24: Riociguat grubu beyin kesitlerinin büyük büyütmedeki görünümü. Riociguat grubu beyin kesitinde gözle görülür düzeyde konjesyonsuz kapiller dilatasyon (**kalm ok**), ancak perivasküler ödem (★) varlığını sürdürmektedir. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 50 µm.



Resim 25: Resveratrol + riociguat grubu beyin kesitlerinin küçük büyütmedeki görünümü. Nöronlar ve glia hücreleri piknotik çekirdeklerin dağılımı gözle görülür şekilde azalmıştır. **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 100 µm.

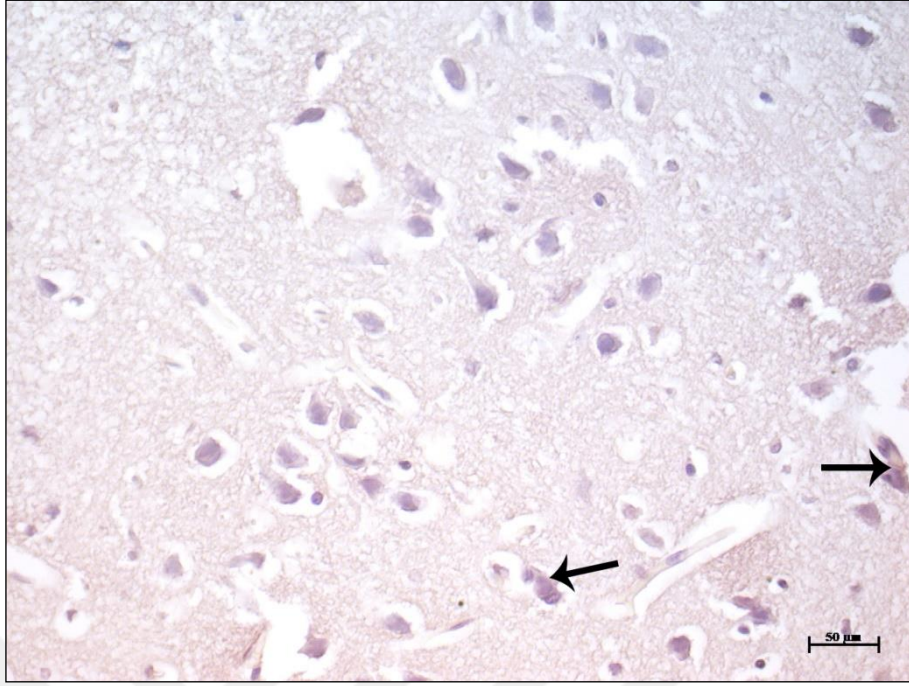


Resim 26: Resveratrol + riociguat grubu beyin kesitlerinin büyük büyütmedeki görünümü. Serebral nöronlar (**ok**) ve glia hücreleri (**ok başı**) kontrol grubuna benzer görünüm izlenmektedir, ayrıca vasküler dilatasyonun yanı sıra perivasküler ödemin ortadan kalktığı izlenmektedir (**kalın ok**). **Boyama:** Hematoksilen&Eozin, **Bar:** 50 µm.

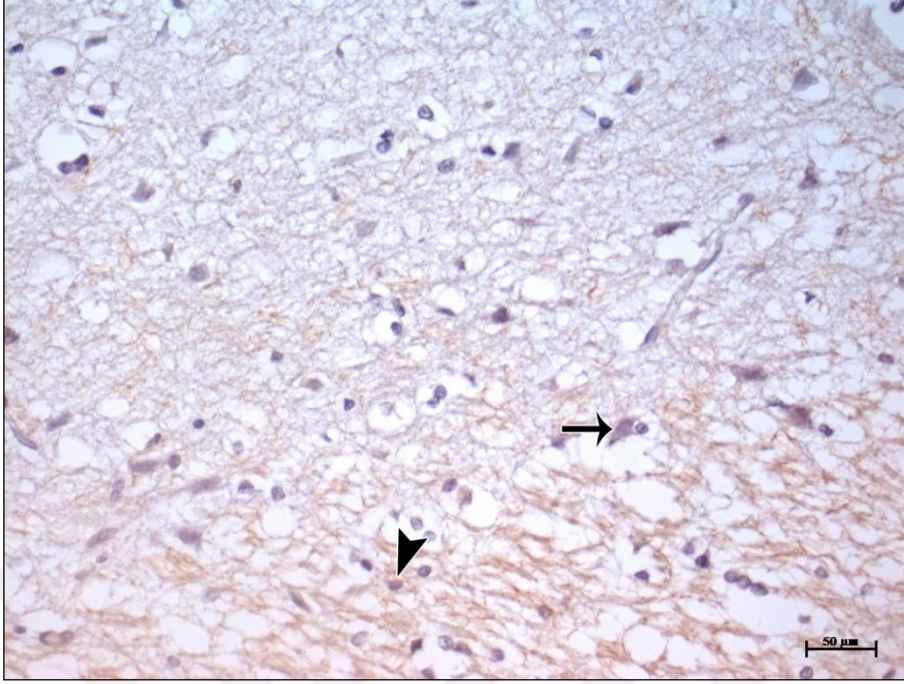
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubunda Bax ve Bcl-2 immunohistokimya kesitleri incelendiğinde her iki apoptoz ilişkili proteininde beyin dokusunda düşük düzeyde eksprese olduğu gözlemlendi. Bax'ın bazı multipolar nöronlarda sitoplazmik lokalizasyonu belirgindi ve dokunun genelinde bax mevcuttu ancak mitokondride oligomer oluşturacak düzeyde eksprese olmadığı ve hücrelerin genel anlamda normal protein düzeyine sahip olduğu görüldü (**Resim 27**). Bu grubun Bcl-2 ekspresyon düzeyinin de bax'a benzer şekilde, dokuda diffüz ancak oldukça düşük düzeyde eksprese olduğu tanımlandı. Ne kadar nöronlarda ve glia hücrelerinde düşük düzeyde ekspresyon izlense de nöronlara ait aksonlarında pozitifliğin daha yoğun olduğu ve bcl-2'nin kısmen buralarda lokalize olduğu göze çarptı (**Resim 28**). Deney grubunda bax ekspresyonunun nöronlarda ve glia hücrelerinde oldukça yoğun şekilde arttığı görüldü (**Resim 29**). Bu bulgu

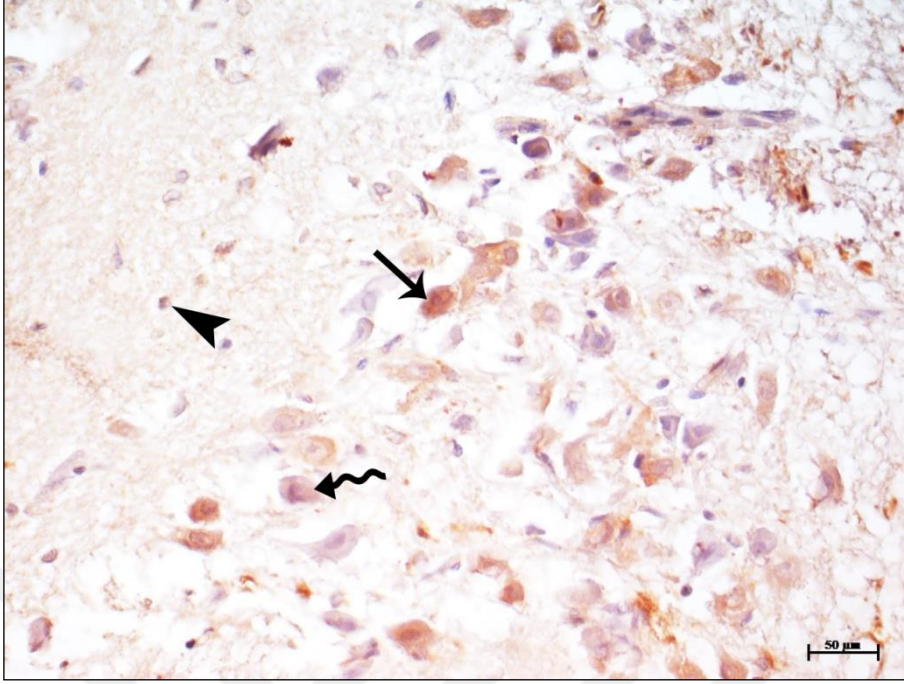
serebral iskemide reperfüzyona bağı olarak nöral ve glia hücre dejenerasyonlarının olduğu, apoptotik hücre ölümünün indüklendiğini gösterdiği sonucuna ulaşıldı. Bcl-2'nin ise ekspresyonunun hücreler düzeyinde kontrol grubuna benzer olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna benzer şekilde aksonlarda bcl-2 ekspresyonu izlenirse de bu düzeyin kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi (**Resim 30**). Resveratrol grubunda bax protein lokalizasyonu diğer gruplara benzer şekildeydi ancak deney grubu ile karşılaştırıldığında immunopozitivite yoğunluğunun kontrol grubuna benzer bir yapıda olduğu sonucuna ulaşıldı (**Resim 31**). Bu grubun bcl-2 immunopozitifliği kontrol ve deney gruplarına benzer lokalize olmuştu ancak pozitifliğin özellikle sinir lifleri düzleminde kontrol grubuna daha yakın olduğu gözle görülür durumdaydı (**Resim 32**). Riociguat grubunda ise bax ekspresyonu kontrol ve resveratrol gruplarına benzer yoğunlukta idi. Nöron perikaryonunda ve glia hücrelerinin sitosolünde pozitiflik izlenirken yoğunluğun deney grubuna göre azaldığı tespit edildi (**Resim 33**). Bu grubun anti-apoptotik bcl-2 ekspresyonu diğer gruplarda gözlemlendiği şekildeki gibi perikaryon da oldukça düşük düzeydeydi ve aksonda bcl-2 yoğunluğu hücre gövdelerine göre daha fazlaydı. Ayrıca özellikle aksonlar göz önünde bulundurulduğunda bu grubun immunopozitivitesi deney grubuna göre gözle görülür düzeyde artmıştı (**Resim 34**). Resveratrol + Riociguat tedavisi uygulanan grupların beyin kesitlerinde bax immunopozitivite düzeyi kontrol grubuna yakın düzeydeydi. Sitoplazmik dağılımı oldukça fazla olduğu için bu grupta immunopozitiflik yok denecek kadar azdı (**Resim 35**). Ayrıca bu grubun bcl-2 ekspresyon durumu da kontrol grubuna benzer nitelikteydi. Nöron hücre gövdeleri ve glia hücrelerinde diffüz bir dağılım izlenirken dendritlerde protein agregasyonu gözle görülür yoğunlukta ve deney grubundan oldukça yoğun bir görünümdeydi (**Resim 36**).



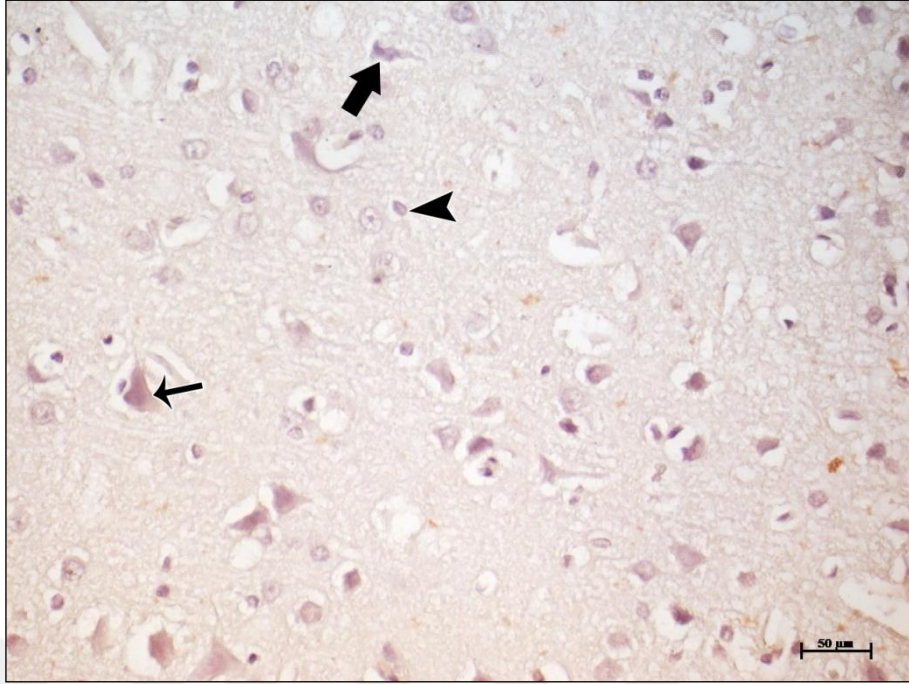
Resim 27: Kontrol grubunda Bax immunohistokimya. Nöronlarda perikaryon düzeyinde çok düşük Bax ekspresyonu (**ok**). **Boyama:** Bax immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



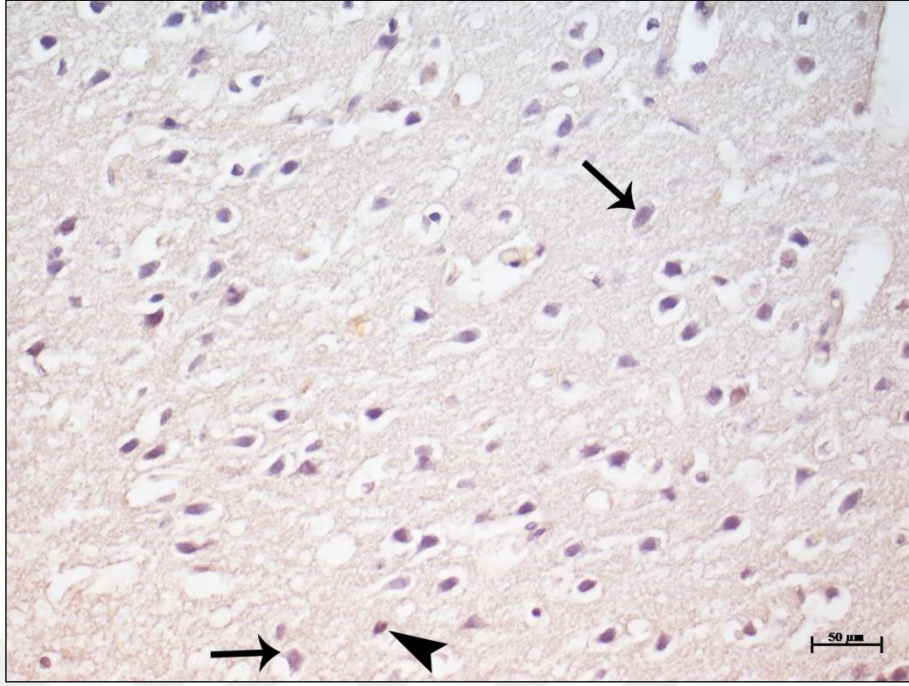
Resim 28: Kontrol grubunda Bcl-2 immunohistokimya. Multipolar nöronlarda düşük düzeyde immunopozitiflik (**ok**), nöroglialarda ve dendritik uzantılarda (**ok başı**) nispeten daha yoğun immunopozitivite. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



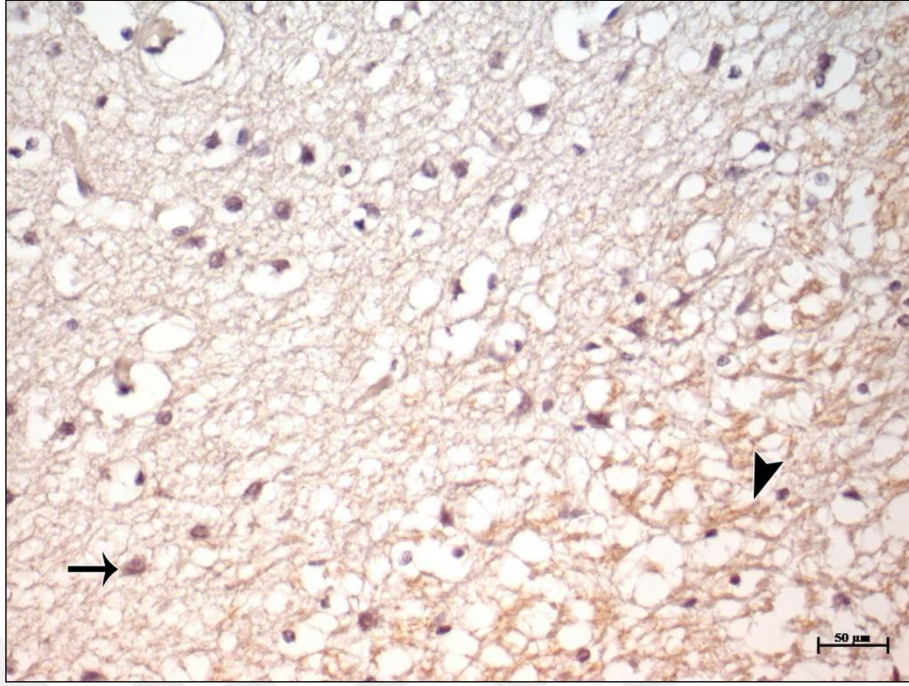
Resim 29: Deney grubunda bax immunohistokimya. Nöronlarda (**ok**) ve glia hücrelerinde (**ok başı**) yoğun bax immunopozitiflik yanı sıra bazı nöronlarda düşük daha düzeyde (**kıvrımlı ok**) immunopozitivite. **Boyama:** Bax immunohistokimya, **Bar:** 50 μ m



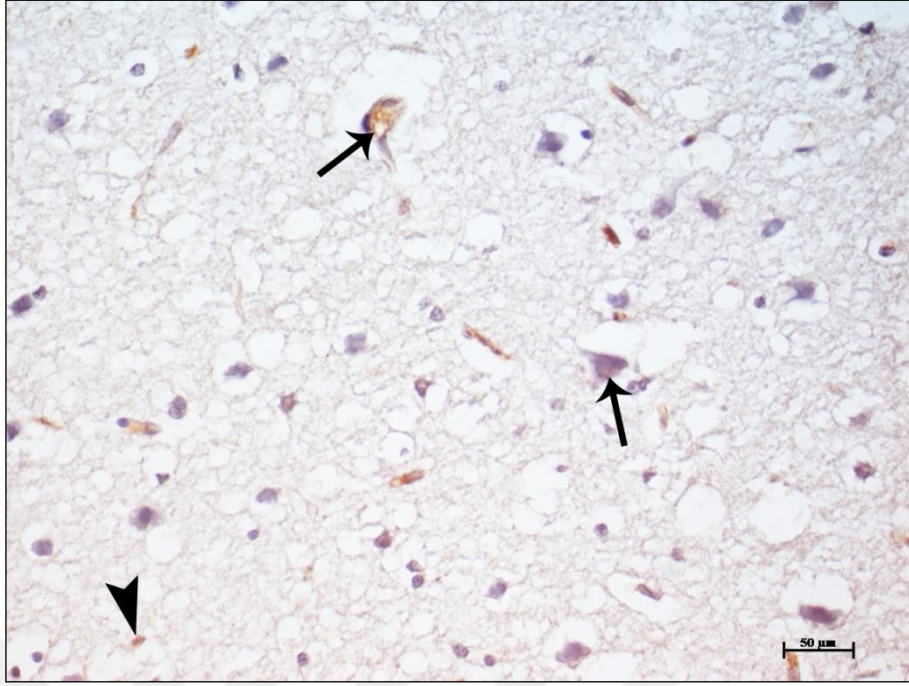
Resim 30: Deney grubunda Bcl-2 immunohistokimya. Normal morfolojiye sahip bazı multipolar nöronlarda immunopozitiflik (**ok**), piknotik nükleuslu nöronlarda düşük düzeyde immunopozitivite (**kalin ok**), nöroglialarda düşük pozitiflik (**ok başı**). **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



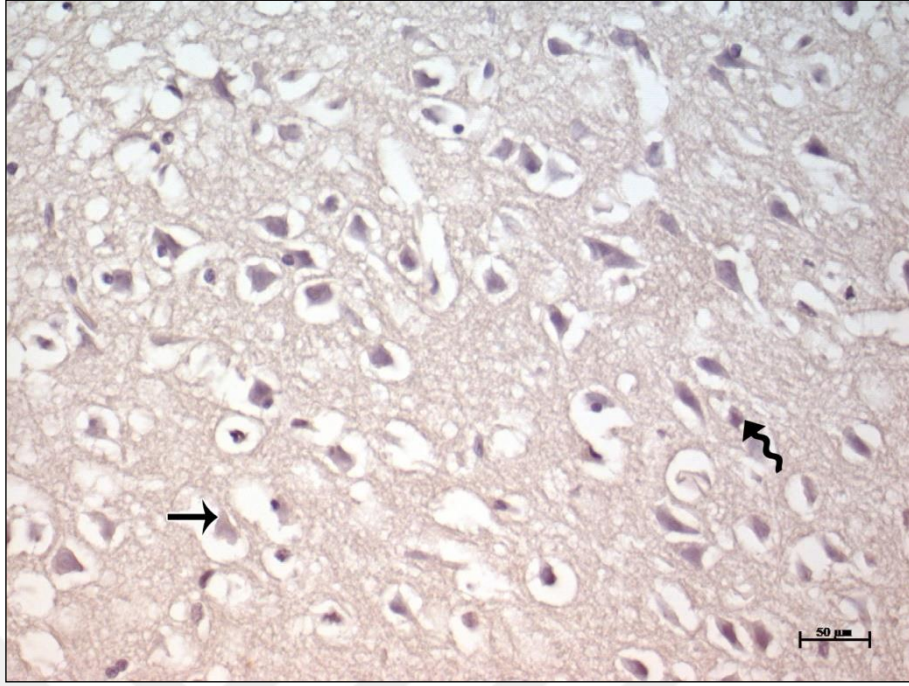
Resim 31: Resveratrol grubunda bax immunohistokimya. Nöron (**ok**) ve nöroglialarda (**ok başı**) düşük düzeyde bax immunopozitiflik. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 µm



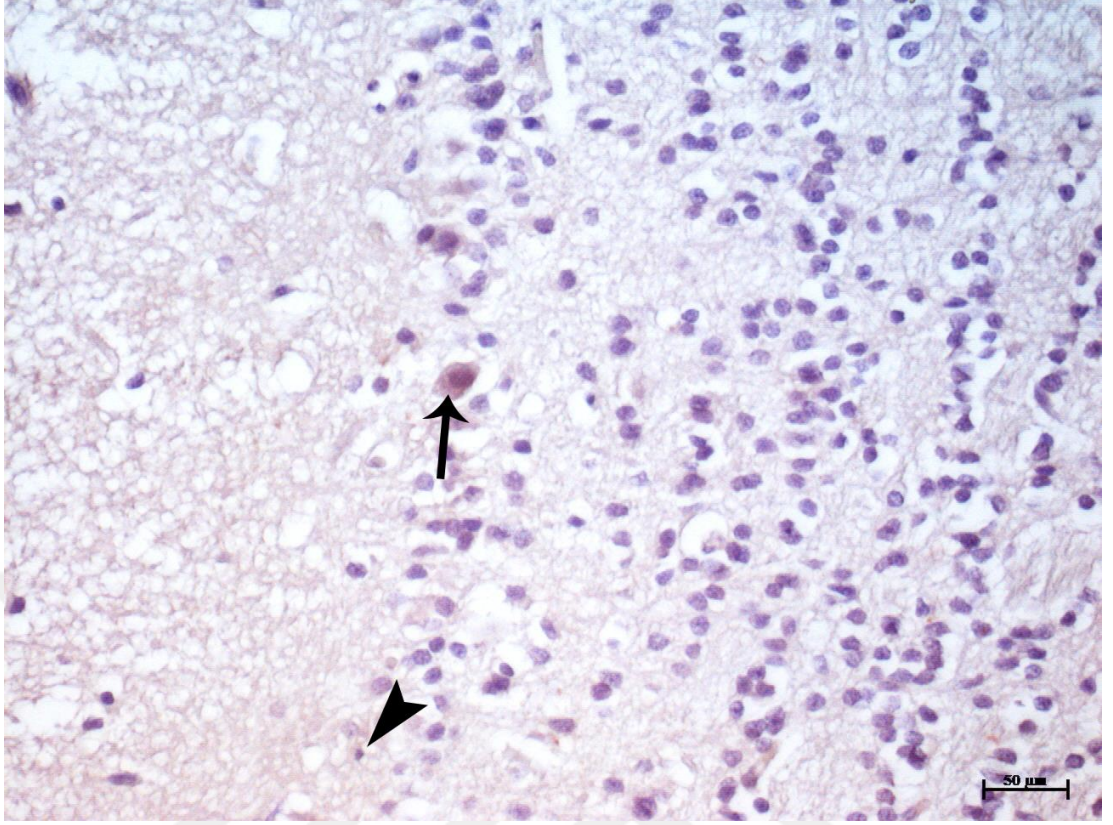
Resim 32: Resveratrol grubunda Bcl-2 immunohistokimya. Nöronlarda (ok), nöroglia ve dendritik uzantılarda (ok başı) Bcl-2 pozitiflik. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



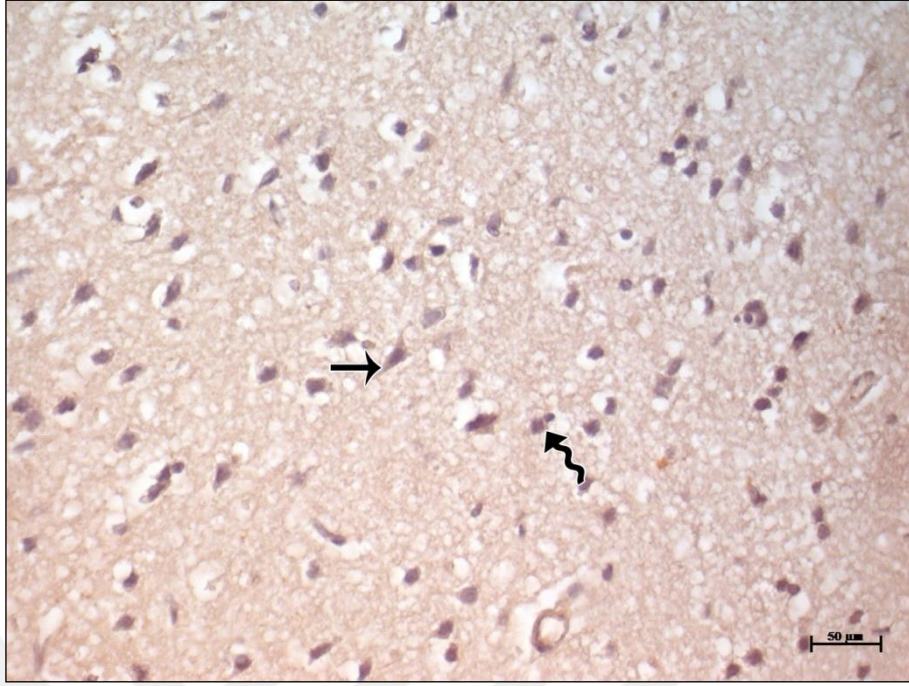
Resim 33: Riociguat grubunda bax immunohistokimya. Nöronlarda (**ok**) ve nöroglia hücrelerinde (**ok başı**) değişen düzeylerde bax immunopozitiflik. **Boyama:** Bax immunohistokimya, **Bar:** 50 µm



Resim 34: Riociguat grubunda Bcl-2 immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve nöroglia hücrelerinde (kivrımlı ok) düşük düzeyde Bcl-2 immunopozitiflik.
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



Resim 35: Resveratrol + Riociguat grubunda bax immunohistokimya. Nöronlarda bax immunpozitiflik (**ok**), nöroglialarda yok denecek düzeyde düşük bax ekspresyonu (**ok başı**). **Boyama:**Bax immunohistokimya, **Bar:** 50 μm



Resim 36: Resveratrol + Riociguat grubunda Bcl-2 immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve nöroglialarda (kivrımlı ok) deney grubuna göre artmış Bcl-2 ekspresyon.

Boyama: Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 50 μm.

5. TARTIŞMA

Vasküler patoloji dışında başka bir neden olmadan meydana gelen serebral fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanan inme, yılda yaklaşık 13 milyon insanı etkilemekte ve yaklaşık 5,5 milyon ölüm görülmektedir (1). Bu inmelerin yaklaşık %88'ini iskemik inmeler oluşturmaktadır. İskemik inmelerin ise yaklaşık %70'i orta serebral arter (MCA) oklüzyonuna bağlı gelişmektedir. Bu nedenle çalışmamızı orta serebral arter oklüzyonu (MCAo) modeli üzerinde gerçekleştirdik. Bir dizi olaylar meydana gelen iskemik inmede yapısal olarak sağlam ancak işlevselliğini kaybeden alan olan penumbra tedavinin ana hedefidir. Çünkü bu alanda hipoperfüzyon düzeltildiği zaman penumbradaki hücreler fonksiyonlarını tekrar kazanabilirler. Günümüzde bu amaçla nöroproteksiyon ve rekanalizasyon tedavileri ön plana çıkmaktadır. Akut iskemik inmede rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rtPA) ile tromboliz onaylanan tek tedavi yöntemidir. rtPA'nın iskemik inmede ilk 4,5 saatte yapılabilmesi nedeniyle ancak hastaların %5'inde kullanılabilir (87). Bu nedenle daha geniş kullanımı olan tedavilere ihtiyaç vardır. Bu nedenle intraluminal MCAo modeli kullandığımız çalışmamızda bir guanilat siklaz stimulatörü olan riociguat ve antioksidan özellikleri daha önce raporlanmış olan resveratrolün tek başına ve kombineli terapötik etkisini araştırdık.

Klinik yaklaşımların yetersiz kaldığı durumlarda serebral iskemi'nin tedavisine yönelik farklı tedavi yöntemleri araştırılmış ancak henüz optimal bir protokol geliştirilememiştir. Ayrıca medikal tedaviyle klinik tablo hafifletilmiş olsa da iskemiye bağlı olarak dokuda biriken reaktif oksijen bileşenleri sinir doku elemanlarında hasara neden olmaya devam etmektedir (106). Bugüne kadar yapılan farklı tedavi araştırmaları konunun güncelliğini ortaya koymaktadır ve bu çalışmaların büyük bir kısmı ya fitoterapötik veya sentetik kimyasal bileşenlerin serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmıştır. Beyin iskemisine bağlı nörodejenerasyon ve tedavi edici ilaç stratejilerinin geliştirilmesine yönelik ilk çalışmalar oldukça eskilere dayanmaktadır. Yakın geçmişte yapılmış bir çalışmada Vakili ve ark. doğal bir karotenoid bileşen olan krosin'in serebral iskemi üzerindeki koruyucu etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar krosin'in düşük dozlarda dahi beyinde iskemiye bağlı oluşan oksidatif stresi azalttığı ve

enfarkt hacmini küçülttüğünü rapor etmiştir (107). Bir başka araştırmada ise takviye besin gıdası şeklinde ticari olarak üretilen ve satılan astaksantin'in tekrarlı serebral iskemi ve reperfüzyon üzerindeki koruyucu etkisi ratlarda araştırılmıştır. Xue ve ark.'larının yaptığı bu araştırmada hayvanların tekrarlı serebral iskemi reperfüzyona maruz kalması durumunda kognitif fonksiyonların bozulduğu, dokuda oksidatif stresin şekillendiği ve başta hipokampal olmak üzere nöronlarda ultrastrüktürel yapısal bozulmaların ve sinir doku hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün şekillendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada astaksantin tedavisi uygulanan hayvanlarda patolojik değişikliklerin ve kognitif bozuklukların anlamlı derecede ortadan kalktığı belirtilmiştir (108). İlaçla iskemi-reperfüzyona bağlı beyin ve nöral hasarı ortadan kaldırmak için yapılan çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Bu çalışmaların hepsi birbirinden farklı doğal veya sentetik kimyasal bileşenlerin koruyucu etkisini araştırmıştır. Bunlardan bir tanesinde Peerless ve ark. serebral iskemi hasarında Fluosol-DA olarak tanımlanan perflorokarbon bazlı sentetik oksijen ve karbondioksit taşıyıcı sentetik kan kullanmıştır (109). Bu çalışmada araştırmacılar beyin iskemisi oluşturdukları hayvanlarda Fluosol-DA'nın iskemiyeye bağlı beyin hasarını azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu bulguların Fluosol-DA'nın iskemik vasküler yapıların dışında kalan mikrovasküler yapıların aktivitesini arttırarak beyini koruduğunu öne sürmüştür. Yine yapılmış bir başka serebral iskemi reperfüzyon hasar çalışmasında Miao ve ark. klorojenik asidin fokal serebral koruyucu etkisini araştırmıştır (110). Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar klorojenik asidin fokal serebral hasarı ortadan kaldırmada inflammatuvar ve hipoksik faktörler ile sinir büyüme faktörleri üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. Her ne kadar Miao ve ark. bu çalışmada hipoksik ve inflammatuvar belirteçler üzerinden hipotezlerini geliştirmiş olsa da, yapılmış çalışmalar genel olarak beyin iskemisinde vasküler sistemin desteklenmesi, iskemik bölgeye oksijenin ulaşması ve metabolik atıkların bölgeden uzaklaştırılması stratejisine dayanmaktadır. Bu sebeple beyin iskemi ve reperfüzyon hasarıyla ilgili yapılan son dönem araştırmaları genellikle vasodilatatör potansiyeli olan, mikrovasküler yapılar üzerinden iskemik alanın oksijenizasyonunu amaçlayan çalışmalar olmuştur (111). Yaptığımız literatür taramasında resveratrol'ün serebral iskemi / reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceğine yönelik bazı sonuçlara ulaşmış olsak ta bir vazodilatör bir ajan olan riociguat'ın etkisini araştıran

bir çalışmaya ulaşamadık. Bunun riociguat gibi sGC aktivatörlerinin ağır yan etkilerinden ötürü Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay noktasında yaşadığı sorunlar ve riociguatın ilgili onayı 2013 yılında almış olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Daha önce yapılmış bir çalışmada Sinha ve ark. MCAo modeliyle serebral iskemi oluşturdukları hayvanlarda bitkisel fenolik bir bileşen olan resveratrol tedavisini 21 gün süreyle uygulamıştır. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar resveratrolün serebral iskemi – reperfüzyonun neden olduğu doku lipid peroksidasyonunu hafiflettiği ve beyin hasarını azalttığını belirtmiştir. Her ne kadar sGC aktivatörleri konusunda serebral iskemi reperfüzyon çalışmaları kısıtlı olsa da, Nitrik oksit (NO) – çözümlü guanilat (sGC) – protein kinaz G (PKG) yolunun uyarılması kardiyak iskemik hasarını azalttığı çalışmalarda gösterilmiştir (102). Methner C ve ark. farelerde sol koroner arteri bağlayarak 30 dakika boyunca kardiyak iskemi oluşturmuş. Daha sonra hayvanlara reperfüzyondan 5 dakika önce ve 5 dakika sonra riociguat verilmiştir. Hayvanlara deneyden 24 saat sonra hem geç gadolinyum destekli manyetik rezonans görüntüleme (LGE-MRI) hem de F-FDG- pozitron emisyon tomografisi (PET) yapılmıştır. Bu deneyin sonunda araştırmacılar iskemiye bağlı patolojinin hafiflediğini rapor etmiştir. Ayrıca trifeniltetrazolyum klorür (TTC) boyama ve reperfüzyondan 2 saat sonra serumda çalışılan troponin-I seviyeleri de riociguat'ın bu etkisini destekleyici sonuçları ortaya koymuştur (103). Literatürde gördüğümüz bu boşluktan ötürü riociguatın MCAo modelinde serebral iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkilerini ayrıca bu ilacın serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisine yönelik bulgular ortaya konulan resveratrol ile kombine tedavisindeki etkisini değerlendirdik. Çalışmamızda iskemi oluşturup ilaç verilmeyen grupla iskemi sonrası riociguat verilen grupları histolojik ve immunohistokimyasal yönden karşılaştırdık. Hematoksilin & eozin ile boyanan kontrol grubu beyin kesitlerinde vasküler yapıların, nöronların, glial hücrelerin normal yapıda olduğu görüldü. İskemi oluşturulan grupta ise kan beyin bariyerinin yıkıldığı, nöronlarda ve glial hücrelerde piknotik çekirdeklerin yoğun miktarda olduğu görüldü. Damar lümenlerinde konjesyon tespit edilen bu grupta ayrıca yoğun bir şekilde perinöral ödem de izlendi. İskemi grubunda ayrıca fokal ve diffuz kanama alanları da tespit edildi. İskemi sonrası riociguat tedavisi uygulanan grupta ise kanama odakları tespit edilemedi. Bu grupta ayrıca yer yer piknotik

çekirdekli hücreler görülse de bunlar iskemi grubuna göre gözle görülür düzeyde azalmıştı. Kapillerler dilatasyonun yanı sıra konjesyona neredeyse hiç rastlanmayan bu grupta yer yer perinöral ödem izlendi.

Mitokondriyal apoptoz proapoptotik (Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) arasındaki dengeye bağlıdır (104). Bax / Bcl- 2 mitokondri zarı yanısıra çekirdek ve edoplazmik retikulum zarları üzerinde de bulunur. İskemik inmede meydana gelen bir dizi olaylar sonucu hücreler apoptoza ve nekroza uğrarlar. Apoptoz süreci başlayınca sitozolde de bulunan Bax proteinleri mitokondri zarına bağlanırlar. Mitokondri zarına bağlanmasıyla mitokondri zarında bulunan sitokrom c ve Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF) sitozole geçer. Sitokrom c, Apaf -1'e bağlanıp prokaspaz 9'u aktive eder ve apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozom prokaspaz 3'ü aktive eder. Kaspaz 3 nükleotidleri ve enzimleri keserek hücre ölümüne neden olur. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl- 2 ise programlanmış hücre ölümü mekanizmasını bloke eder (104). Zhao ve ark. yaptıkları bir çalışmada Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu iskemik hasara karşı koruyucu olduğunu sitokrom c ve kaspaz 3'ü inhibe ettiğini ancak Bax ekspresyonunu etkilemediğini göstermişlerdir (104). Linnik ve ark. serebral kortekse Bcl-2 enjekte edildikten 24 saat sonra MCA ve aynı taraf karotis kommunis kalıcı olarak oklüde etmiştir. Oklüzyondan 24 saat sonra trifeniltetrazolyum klorür ile boyanarak iskemik alanlar gösterilmiş. Sonuç olarak egzojenik Bcl-2'nin dahi nöronları iskemiye karşı koruduğunu gösterilmiştir (105). Bax / Bcl-2 arasındaki denge hücrenin kaderini belirlemektedir. Deneysel çalışmamızda Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarını da değerlendirdiğimizde iskemi grubunda yoğun bir şekilde Bax ekspresyonu gözlemlememize rağmen iskemi sonrası riociguat verilen grupta Bax ekspresyonunun iskemi grubuna göre anlamlı derecede azaldığı Bcl-2 immunopozitifliğinin ise özellikle aksonlarda arttığı görüldü. Bu bulgular ayrıca mikroskobik incelemede gördüğümüz vazodilatasyon durumu, riociguatın serebral iskemik hasarı azalttığını göstermektedir.

İskemik inmede ortaya çıkan serbest reaktif oksijen bileşenleri iskemik inmede hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Reaktif oksijen radikalleri, endojenik antioksidan enzimlerin aktivitesini baskılayarak hasarın şiddetini artırır. Reperfüzyondan sonra artan oksijen miktarıyla beraber reaktif oksijen radikalleri daha da artarak hasarı daha da şiddetlendirebilir. Bu nedenle inme tedavisinde

önemli çalışma alanlarından birisi de antioksidanlardır. Başlıca üzüm, şarap, yer fıstığı ve soyada bulunan resveratrol iyi bilinen bir antioksidandır. Resveratrol nitrik oksit sentetazı artırarak endotel hücrelerinde güçlü vazodilatatör olan nitrik oksit (NO) sentezini artırır (112). Böylece antihipertansif, antitrombotik ve antiaterosklerotik etki gösterir. NO, lökositlerin damar düz kaslarına yapışmasını ve damar duvarına göç etmesini baskılayarak ateroskleroza karşı koruyucu olmaktadır. Aynı zamanda endotelin-1 sentezini de azaltarak düz kaslarda ve endotel hücrelerinde oksidatif stresi azaltır. Resveratrol NAD(P)H:kinon- oksidoredüktaz 1 (NQO1), SOD1, SOD2, glutasyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerini artırarak ve reaktif oksijen radikalleri üreten NADPH oksidaz enzimlerinin aktivitelerini de azaltarak antioksidan özellik gösterir. Resveratrolün apoptoza karşı ve hipokampal nöronları iskemiyeye karşı koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Hou Y ve ark. yaptıkları bir çalışmada MCAo modelinde resveratrolün nöroprotektif olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada Hou Y ve ark. Western blot yöntemini kullanarak Bax ve kaspaz 3'ün önemli ölçüde düştüğünü Bcl-2 ekspresyonunun ise arttığını göstermişlerdir. Apoptotik hücreleri göstermek için apoptotik hücrelerdeki DNA fragmentasyonlarını tespit etmek için TUNEL Assay yöntemi kullanılmaktadır. Hou Y ve ark.'nın bu deneyi sonucunda iskemi grubunda çok sayıda TUNEL pozitif nöron varlığı gösterilmiş, buna karşın iskemi sonrası resveratrol verilen grupta ise TUNEL pozitif nöron sayısında anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular resveratrolün serebral iskemide apoptozu inhibe ettiğini göstermektedir (97). Bizim yaptığımız çalışmada da MCAo iskemi modelinde resveratrolün koruyucu etkisi incelenmiştir. İskemi sonrası resveratrol verdiğimiz grupta nöron ve glial hücrelerde piknozis, damarlarda konjesyon, perivasküler alanlarda ödem gözlenirse de iskemi grubuna göre patolojik özelliklerin azaldığı daha sağlıklı bir hücre morfoloji ve sinir dokusu yapısı gözlemledik. Bax ekspresyonunun resveratrol verildikten sonra iskemi grubuna göre azaldığı, Bcl-2 ekspresyonunun ise aksonlarda iskemi grubuna göre arttığını tespit ettik. Bu yönüyle elde ettiğimiz bulgular literatürler uyumlu olup, resveratrolün serebral iskemiyeye karşı koruyucu bir ajan olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız deneyde MCAo iskemi modelinde serebral beyin dokusu hasarına karşı resveratrol + riociguat kombinasyonunun etkilerini de araştırdık. Çalışmamızda kombine tedavi uyguladığımız grupta herhangi bir hemorajinin gözlenmediğini,

vasküler yapılarda dilatasyon'un olduğunu, piknotik çekirdekli hücrelerde ciddi azalma olduğunu, perinöral ve perivasküler ödemin de kaybolduğunu tespit ettik. Ayrıca Bax immunopozitifliğinin yok denecek kadar az olduğunu ve bcl-2 ekspresyonunun kontrol grubuyla aynı olduğunu da gözlemledik. Bu bulgular değerlendirildiğinde güçlü bir vazodilatatör olan riociguat ile antioksidan özelliği iyi bilinen resveratrolün kombine bir şekilde kullanılması iskemik inmeye karşı etkili olabileceği sonucuna ulaştık.



6. SONUÇ

Bu yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgular alanında ilk olma özelliği taşımaktadır. Serebral iskeminin neden olduğu nörolojik disfonksiyon ve beyin dokusu hasarı herkes tarafından bilinen ve deneysel çalışmalarla da araştırılmakta olan bir konudur. Klinik yaklaşımların tedavi hedefi girişimsel ve cerrahi müdahale ile hastaya yaklaşım sağlamaktadır. Bu bakımdan iskemiye bağlı nörodejenerasyonu azaltma veya ortadan kaldırmaya yönelik geliştirilmiş bir tedavi metodu bulunmamaktadır. Literatürde bugüne kadar sayısız organik ve sentetik ajan serebral iskemiye karşı bu ajanların koruyucu etkisini incelemiştir. Serebral iskemiye bağlı hipoksi durumunda ortaya çıkan oksidatif stress moleküler düzeyde patolojik durumun daha ağır seyretmesini desteklemektir. Bu sebeptendir ki serebral iskemiye karşı bu ajanların etkisini inceleyen araştırmacılar, iskemiye bağlı apoptotik süreci değerlendirerek ilgili ajanın etkinliğini incelemiştir. Yaptığımız mevcut çalışmada literatürde deneysel serebral iskemide koruyucu olabileceğine yönelik bazı bulgular öne sürülen resveratrol ile çözümler guanilat siklaz aktivatörü riociguatın hem öz hem de kombine tedavisindeki protektif etkisini inceledik. Sonuçlarımız resveratrolün literatüre uyumlu şekilde protektif bir bileşen olduğunu göstermektedir. Bunu sağlarken güçlü antioksidan kapasitesinin yanı sıra literatürün öne sürdüğü gibi vazodilatör bir ajan olmasıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Riociguat tedavisi uyguladığımız hayvanlarda da durum resveratrol grubuna benzer nitelikteydi. Son dönemlerde yapılan çalışmalar riociguatın da antioksidan bir özelliğe sahip olduğunu öne sürmektedir. Ancak her iki ilacın da uygulandığı gruptaki hayvanlarda nöroprotektif etki çok daha başarılıydı. Bu elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda resveratrol ve riociguatın kombine tedavisinin serebral MCAo olgularında klinik müdahale öncesinde destekleyici bir tedavi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak her ne kadar elde ettiğimiz bulgular gözle görülür bir koruyucu etkinlik sağlasa da deneysel çalışmaların kliniğe uyarlanabilmesi için çok daha fazla sayıda hayvanın ve çok daha sayıda dozun test edildiği yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7609. Published 2020 Oct 15.
2. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2009;8(4):355-369.
3. Appelros P, Stegmayr B, Terént A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. *Stroke.* 2009;40(4):1082-1090.
4. Chen PH, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D. Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther.* 2012;18(6):452-456.
5. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24(1):35-41.
6. Kapral MK, Fang J, Hill MD, et al. Sex differences in stroke care and outcomes: results from the Registry of the Canadian Stroke Network. *Stroke.* 2005;36(4):809-814.
7. Cruz-Flores S, Rabinstein A, Biller J, et al. Racial-ethnic disparities in stroke care: the American experience: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011;42(7):2091-2116.
8. Sacco RL, Boden-Albala B, Abel G, et al. Race-ethnic disparities in the impact of stroke risk factors: the northern Manhattan stroke study. *Stroke.* 2001;32(8):1725-1731.
9. Bravata DM, Wells CK, Gulanski B, et al. Racial disparities in stroke risk factors: the impact of socioeconomic status. *Stroke.* 2005;36(7):1507-1511.
10. Horner RD, Matchar DB, Divine GW, Feussner JR. Racial variations in ischemic stroke-related physical and functional impairments. *Stroke.* 1991;22(12):1497-1501.
11. Uchino K, Risser JM, Smith MA, Moyé LA, Morgenstern LB. Ischemic stroke subtypes among Mexican Americans and non-Hispanic whites: the BASIC Project. *Neurology.* 2004 Aug;63(3):574-576.
12. Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF; ISGS investigators. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an

association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke*. 2008;39(5):1586-1589.

13. Ahmed N, Wahlgren G. High initial blood pressure after acute stroke is associated with poor functional outcome. *J Intern Med*. 2001;249(5):467-473.

14. Yatsu FM, Zivin J. Hypertension in acute ischemic strokes. Not to treat. *Arch Neurol*. 1985;42(10):999-1000.

15. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies [published correction appears in *Lancet*. 2003 Mar 22;361(9362):1060]. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-1913.

16. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*. 2010;376(9735):112-123.

17. Chen R, Ovbiagele B, Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2016;351(4):380-386.

18. Ergul A, Li W, Elgebaly MM, Bruno A, Fagan SC. Hyperglycemia, diabetes and stroke: focus on the cerebrovasculature. *Vascular Pharmacology*. 2009 Jul;51(1):44-49.

19. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, Degan D, Ornello R, Carolei A. The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. *Cardiol Clin*. 2016;34(2):255-268.

20. Girijala RL, Sohrabji F, Bush RL. Sex differences in stroke: Review of current knowledge and evidence. *Vasc Med*. 2017;22(2):135-145.

21. Hindy G, Engström G, Larsson SC, et al. Role of Blood Lipids in the Development of Ischemic Stroke and its Subtypes: A Mendelian Randomization Study. *Stroke*. 2018;49(4):820-827.

22. Palomäki H, Kaste M. Regular light-to-moderate intake of alcohol and the risk of ischemic stroke. Is there a beneficial effect?. *Stroke*. 1993;24(12):1828-1832.

23. Hillbom M, Numminen H, Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. *Stroke*. 1999;30(11):2307-2312.

24. Love BB, Biller J, Jones MP, Adams HP Jr, Bruno A. Cigarette smoking. A risk factor for cerebral infarction in young adults. *Arch Neurol.* 1990;47(6):693-698.
25. Kamalian S, Lev MH. Stroke Imaging. *Radiol Clin North Am.* 2019;57(4):717-732.
26. Kamalian S, Morais LT, Pomerantz SR, et al. Clot length distribution and predictors in anterior circulation stroke: implications for intra-arterial therapy. *Stroke.* 2013;44(12):3553-3556.
27. Meyne JK, Zimmermann PR, Rohr A, et al. Thrombectomy vs. Systemic Thrombolysis in Acute Embolic Stroke with High Clot Burden: A Retrospective Analysis. *Rofo.* 2015;187(7):555-560.
28. Kidwell CS, Hsia AW. Imaging of the brain and cerebral vasculature in patients with suspected stroke: advantages and disadvantages of CT and MRI. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006;6(1):9-16.
29. Lev MH, Segal AZ, Farkas J, et al. Utility of perfusion-weighted CT imaging in acute middle cerebral artery stroke treated with intra-arterial thrombolysis: prediction of final infarct volume and clinical outcome. *Stroke.* 2001;32(9):2021-2028.
30. Leslie-Mazwi TM, Hirsch JA, Falcone GJ, et al. Endovascular Stroke Treatment Outcomes After Patient Selection Based on Magnetic Resonance Imaging and Clinical Criteria. *JAMA Neurol.* 2016;73(1):43-49.
31. Ay H, Koroshetz WJ, Benner T, et al. Neuroanatomic correlates of stroke-related myocardial injury. *Neurology.* 2006;66(9):1325-1329.
32. Kumar S, Selim MH, Caplan LR. Medical complications after stroke. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):105-118.
33. Jensen JK, Atar D, Mickley H. Mechanism of troponin elevations in patients with acute ischemic stroke. *Am J Cardiol.* 2007;99(6):867-870.
34. Nolte CH, Scheitz JF, Endres M. Troponinerhöhung nach ischämischem Schlaganfall [Troponin elevation in ischemic stroke patients]. *Med Klin Intensivmed Notfmed.* 2017;112(3):222-226.
35. Abboud H, Berroir S, Labreuche J, Orjuela K, Amarenco P; GENIC Investigators. Insular involvement in brain infarction increases risk for cardiac arrhythmia and death. *Ann Neurol.* 2006;59(4):691-699.

36. Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, Dawson NV, Baker DW. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke. *Neurology*. 2003;60(4):620-625.
37. Sellars C, Bowie L, Bagg J, et al. Risk factors for chest infection in acute stroke: a prospective cohort study. *Stroke*. 2007;38(8):2284-2291.
38. Martino R, Foley N, Bhogal S, Diamant N, Speechley M, Teasell R. Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke*. 2005;36(12):2756-2763.
39. O'Donnell MJ, Kapral MK, Fang J, et al. Gastrointestinal bleeding after acute ischemic stroke. *Neurology*. 2008;71(9):650-655.
40. Harari D, Coshall C, Rudd AG, Wolfe CD. New-onset fecal incontinence after stroke: prevalence, natural history, risk factors, and impact. *Stroke*. 2003;34(1):144-150.
41. Khan Z, Starer P, Yang WC, Bhola A. Analysis of voiding disorders in patients with cerebrovascular accidents. *Urology*. 1990;35(3):265-270.
42. Brandstater ME, Roth EJ, Siebens HC. Venous thromboembolism in stroke: literature review and implications for clinical practice. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992;73(5-S):S379-S391.
43. Kamphuisen PW, Agnelli G. What is the optimal pharmacological prophylaxis for the prevention of deep-vein thrombosis and pulmonary embolism in patients with acute ischemic stroke?. *Thromb Res*. 2007;119(3):265-274.
44. Morris PL, Shields RB, Hopwood MJ, Robinson RG, Raphael B. Are there two depressive syndromes after stroke?. *J Nerv Ment Dis*. 1994;182(4):230-234.
45. Castillo J, Dávalos A, Marrugat J, Noya M. Timing for fever-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1998;29(12):2455-2460.
46. Chugh C. Acute Ischemic Stroke: Management Approach. *Indian J Crit Care Med*. 2019;23(Suppl 2):S140-S146.
47. Derex L, Cho TH. Mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *Rev Neurol (Paris)*. 2017;173(3):106-113.
48. Bouthillier A, van Loveren HR, Keller JT. Segments of the internal carotid artery: a new classification. *Neurosurgery*. 1996;38(3):425-433.

49. Munakomi S, M Das J. Neuroanatomy, Recurrent Artery of Heubner. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 31, 2021.
50. Rhoton AL Jr. The supratentorial arteries. *Neurosurgery*. 2002;51(4 Suppl):S53-S120.
51. Cilliers K, Page BJ. Anatomy of the Middle Cerebral Artery: Cortical Branches, Branching Pattern and Anomalies. *Turk Neurosurg*. 2017;27(5):671-681.
52. Rhoton AL Jr. The cerebrum. Anatomy. *Neurosurgery*. 2007;61(1 Suppl):37-119.
53. Párraga RG, Ribas GC, Andrade SE, de Oliveira E. Microsurgical anatomy of the posterior cerebral artery in three-dimensional images. *World Neurosurg*. 2011;75(2):233-257.
54. Hun K., Silav G., Ugur H.Ç., Unlu A. . Serebral metabolizma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2001; 54(1), 51-56.
55. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med*. 2011;2011:823525.
56. Harder DR. Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ Res*. 1987;60(1):102-107.
57. Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol*. 2003;553(Pt 2):407-414.
58. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):483-495.
59. Brouns R, Sheorajpanday R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. *Clin Chim Acta*. 2008;397(1-2):27-31.
60. Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol*. 2009;61(6):321-330.
61. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017;38(7):1167-1186.
62. Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress--assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012;50(3):219-230.

63. Che Y, Wang JF, Shao L, Young T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. *J Psychiatry Neurosci*. 2010;35(5):296-302.
64. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*. 1999;9(1):119-131.
65. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173-185.
66. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995;26(11):2120-2126.
67. Dohmen C, Bosche B, Graf R, et al. Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 2007;38(1):56-61.
68. Green D. Coagulation cascade. *Hemodial Int*. 2006;10 Suppl 2:S2-S4.
69. Harshfield EL, Sims MC, Traylor M, Ouwehand WH, Markus HS. The role of haematological traits in risk of ischaemic stroke and its subtypes [published correction appears in *Brain*. 2020 Mar 1;143(3):e24]. *Brain*. 2020;143(1):210-221.
70. Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem*. 2015;22(10):1258-1277.
71. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*. 1998;51(3 Suppl 3):S62-S68.
72. D'Orsi B, Mateyka J, Prehn JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int*. 2017;109:162-170.
73. Sheng R, Liu XQ, Zhang LS, et al. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy*. 2012;8(3):310-325.
74. Sekerdag E, Solaroglu I, GURSOY-OZDEMIR Y. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(9):1396-1415.
75. Grupke S, Hall J, Dobbs M, Bix GJ, Fraser JF. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;129:1-9.
76. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 2000;179(S 1-2):1-33.

77. Mousavi SA, Saadatnia M, Khorvash F, Hoseini T, Sariaslani P. Evaluation of the neuroprotective effect of dextromethorphan in the acute phase of ischaemic stroke. *Arch Med Sci.* 2011;7(3):465-469.
78. Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S; Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke (IMAGES) Study Investigators. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;363(9407):439-445.
79. Lalkovičová M, Danielisová V. Neuroprotection and antioxidants. *Neural Regen Res.* 2016;11(6):865-874.
80. Lakhani SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 2009;7:97. Published 2009 Nov 17.
81. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1(Suppl 1):S232-S240.
82. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke.* 1995;26(4):676-681.
83. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol.* 2000;10(2):283-292.
84. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(5):e331-e339.
85. Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis.* 2009;14(4):469-477.
86. Manabat C, Han BH, Wendland M, et al. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain. *Stroke.* 2003;34(1):207-213.
87. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, et al. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation.* 2011;123(7):750-758.
88. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences

- following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1(1):53-60.
89. Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, et al. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol.* 2006;201(2):324-334.
90. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445-3454. Published 2015 Jul 2.
91. Gerriets T, Li F, Silva MD, et al. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods.* 2003;122(2):201-211.
92. Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Høyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12(3):484-490.
93. Kofler J, Hattori K, Sawada M, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods.* 2004;136(1):33-44.
94. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979;10(3):267-272.
95. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 2003;44(2):85-95.
96. Ross DT, Duhaime AC. Degeneration of neurons in the thalamic reticular nucleus following transient ischemia due to raised intracranial pressure: excitotoxic degeneration mediated via non-NMDA receptors?. *Brain Res.* 1989;501(1):129-143.
97. Hou Y, Wang K, Wan W, Cheng Y, Pu X, Ye X. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats. *Genes Dis.* 2018;5(3):245-255. Published 2018 Jun 15.
98. Hong JH, Lee H, Lee SR. Protective effect of resveratrol against neuronal damage following transient global cerebral ischemia in mice. *J Nutr Biochem.* 2016;27:146-152.

99. Fang L, Gao H, Zhang W, Zhang W, Wang Y. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3219-3226.
100. Zhou ZX, Mou SF, Chen XQ, Gong LL, Ge WS. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- κ B in animal models of acute pharyngitis. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):1269-1274.
100. Pearson K.J., Baur J.A., Lewis K.N., Peshkin L., Price N.L., Labinskyy N., Swindell W.R., Kamara D., Minor R.K., Perez E., et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending lifespan. *Cell Metab*. 2008;8:157–168.
101. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:161-169.
102. Methner C, Buonincontri G, Hu CH, et al. Riociguat reduces infarct size and post-infarct heart failure in mouse hearts: insights from MRI/PET imaging. *PLoS One*. 2013;8(12):e83910. Published 2013 Dec 31.
103. Frey R, Becker C, Saleh S, Unger S, van der Mey D, Mück W. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Riociguat. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(6):647-661.
104. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem*. 2003;85(4):1026-1036.
105. Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1995;26(9):1670-1675.
106. Saito, A., Maier, C. M., Narasimhan, P., Nishi, T., Song, Y. S., Yu, F., ... & Chan, P. H. (2005). Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Molecular neurobiology*, 31(1), 105-116.
107. Vakili, A., Einali, M. R., & Bandegi, A. R. (2014). Protective effect of crocin against cerebral ischemia in a dose-dependent manner in a rat model of ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(1), 106-113.

108. Xue, Y., Qu, Z., Fu, J., Zhen, J., Wang, W., Cai, Y., & Wang, W. (2017). The protective effect of astaxanthin on learning and memory deficits and oxidative stress in a mouse model of repeated cerebral ischemia/reperfusion. *Brain research bulletin*, 131, 221-228.
109. Peerless, S. J., Ishikawa, R., Hunter, I. G., & Peerless, M. J. (1981). Protective effect of Fluosol-DA in acute cerebral ischemia. *Stroke*, 12(5), 558-563.
110. Miao, M., Cao, L., Li, R., Fang, X., & Miao, Y. (2017). Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat models. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(4), 556-563.
111. Sun, Y., Xu, D. P., Qin, Z., Wang, P. Y., Hu, B. H., Yu, J. G., ... & Liu, X. (2018). Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on ischemic stroke. *European journal of pharmacology*, 818, 604-609.
112. Gordish KL, Beierwaltes WH. Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(5):F542-F550. doi:10.1152/ajprenal.00437.2013