



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA MİNOSİKLİNİN BEYİN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Boran URFALI

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yard.Doç.Dr.Mustafa ARAS

HATAY – 2013

T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA MİNOSİKLİNİN BEYİN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Boran URFALI

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yard.Doç.Dr.Mustafa ARAS

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından 9424 proje
numarası ile desteklenmiştir .**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**Tez Adı: SIÇANLARDA MİNOSİKLİNİN BEYİN İSKEMİ-
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. Boran URFALI

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....
Prof.Dr Ali ÖZCAN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....
Doç.Dr. Yurdal SERARSLAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....
Yard.Doç.Dr. Mustafa ARAS
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1.(İsim ve imza).....
2.(İsim ve imza).....
3.(İsim ve imza).....
4.(İsim ve imza).....
5.(İsim ve imza).....

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR	vi
RESİMLER	ix
KISALTMALAR	x
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Beyin Embriyolojisi	4
2.2. Beyin Vasküler Anatomisi	17
2.3. Ratlarda Beyin	23
2.4. Epidemiyoloji ve İnsidans	23
2.5. Beyin İskemi-Reperfüzyonu	24
2.5.1. Serebral İskemi Tanımı	24
2.5.2. Tarihçe	25
2.5.3. Beyin Kan Akımı ve Serebral Perfüzyon Basıncı	27
2.5.4. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	37
2.5.5. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarında Patolojik Değişiklikler	41
2.5.6. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarlanmalarının Sınıflandırılması	41
2.5.7. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarında Tedavi Yöntemleri	43

2.5.8. Beyin İskemi-Reperfüzyon Modelleri	47
2.5.9. İnsan Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı: Deneysel Modeller ile Benzerlikleri ve Farklılıkları	50
2.6. Minosiklin	51
2.6.1. Minosiklinin Farmakokinetik Özellikleri	51
2.6.2. Minosiklinin Nöral Dokular Üzerindeki Etkileri	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Anestezi Tekniği	56
3.2. Cerrahi Teknik ve Beyin İskemi-Reperfüzyon Modeli	56
3.3. Patolojik İnceleme	59
3.4. Biyokimyasal İnceleme	60
3.4.1. Dokularda Homojenizasyon İşlemleri	60
3.4.2. Biyokimyasal Analizler	65
3.5. İstatistiksel Analiz	77
4. BULGULAR	78
4.1. Histopatolojik Bulgular	78
4.2. Biyokimyasal Bulgular	82
4.2.1. MDA Değerleri	82
4.2.2. SOD Enzim Değerleri	83
4.2.3. GPX Enziminin Değerleri	84
4.2.4. Nitrik Oksit (NO) Değerleri	86
4.2.5. CAT Enziminin Değerleri	87

4.2.6. CK Enziminin Değerleri	88
4.2.7. CK-MB Enziminin Değerleri	89
4.2.8. LDH Enziminin Değerleri	90
4.2.9. NSE Enziminin Değerleri	92
4.2.10. Protein S100B Değerleri	93
5. TARTIŞMA	95
6. SONUÇLAR	104
7. KAYNAKLAR	106
8. ÖZGEÇMİŞ	117

TABLÖLAR VE ŐEKİLLER

Şekil 1: Embriyodaki n6ral oluk, n6ral t6p ve n6ral kresti g6steren transvers kesitler	5
Şekil 2: A. Yaklaşık 22. G6n6ndeki insan embriyosunun dorsal g6r6n6m6	6
Şekil 3: Gelişmekte olan insan beyninin lateral g6r6nt6leri	9
Şekil 4: Gelişmekte olan insan beyninin medial g6r6nt6leri	9
Şekil 5: Carnegie evre (stage) 12'den neonatal d6neme kadar insan beyninin damarsal gelişimine bakış	11
Şekil 6: Serebral damarların gelişimi	13
Şekil 7: Carnegie evre (stage) 12'den neonatal d6neme kadar insan beyninin ven6z sistem gelişimine bakış	16
Şekil 8: Cerebral hemisferlerin vask6ler alanlarını g6steren diyagram	20
Şekil 9: Kafa tabanında Willis Poligonu'nun g6r6n6m6	22
Şekil 10: Protein standart grafiği	65
Şekil 11: Grafik NO ₁ , nitrit standart grafiği	74
Şekil 12: Konjesyonun gruplara g6re dağılımı	79
Şekil 13: Vakuolizasyonun gruplara g6re dağılımı	79
Şekil 14: Eozinofilik dejenerasyonun gruplara g6re dağılımı	80
Şekil 15: MDA Değerlerinin Şematik Analizi	83
Şekil 16: SOD Değerlerinin Şematik Analizi	84
Şekil 17: GSH-Px Değerlerinin Şematik Analizi	85
Şekil 18: NO Değerlerinin Şematik Analizi	86
Şekil 19: CAT Değerlerinin Şematik Analizi	88
Şekil 20: CK Değerlerinin Şematik Analizi	89

Şekil 21: CK-MB Değerlerinin Şematik Analizi	90
Şekil 22: LDH Değerlerinin Şematik Analizi	91
Şekil 23: NSE Değerlerinin Şematik Analizi	92
Şekil 24: S100b Değerlerinin Şematik Analizi	94
Tablo 1: Çalışmada kullanılan modifiye histopatolojik skarlama sistemi	60
Tablo 2: Lowry metodu	63
Tablo 3: Protein Standart Grafiğinin Çizimi	64
Tablo 4: SOD deney şeması	67
Tablo 5: CAT deney şeması	68
Tablo 6: GSH-Px deney şeması	70
Tablo 7: GSH-Px deney şeması	71
Tablo 8: MDA deney şeması II	72
Tablo 9: Nitrit çalışma tablosu	76
Tablo 10: Histopatolojik skarlamanın istatistiksel analizi	80
Tablo 11: Grafik NO ₁ , nitrit standart grafiği	83
Tablo 12: SOD Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	84
Tablo 13: GSH-Px Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	85
Tablo 14: Nitrik Oksit (NO) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	87
Tablo 15: Katalaz (CAT) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	88
Tablo 16: Kreatin Kinaz (CK) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	89
Tablo 17: Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	90
Tablo 18: Laktat Dehidrogenaz (LDH) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri	91

Tablo 19: Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri 93

Tablo 20: Protein S100B (Kalsiyum Bağlayıcı Protein B) Grubu One-Way Anova2
Değerleri 94



RESİMLER

- Resim 1:** Yirmi günlük fare embriyosunun elektron mikroskobu altındaki görüntüsü 4
- Resim 2:** Dorsal bölgeden migrasyona uğrayan nöral tüp (NT) ve nöral krest (oklar) hücreler 6
- Resim 3:** İnsan embriyosunun yaklaşık 27. Gününe denk gelen fare embriyosunun elektron mikroskobundaki sagittal görüntüsü 7
- Resim 4:** İnsan embriyosunun yaklaşık 32. Gününe denk gelen fare embriyosunun elektron mikroskobundaki sagittal görüntüsü. 8
- Resim 5:** Boyun diseksiyonu sonrası cerrahi alan 58
- Resim 6:** Bilateral olarak atravmatik klemp ile oklüde edilmiş CCA'lar 59
- Resim 7:** Normal beyin dokusu. 81
- Resim 8:** Serebral dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı 81
- Resim 9:** Minosiklin uygulaması sonrası iskemi-reperfüzyon hasarında dejenerasyon bulgularında gözlenen kısmi düzelme. 82

KISALTMALAR

ACA:	Arteria cerebri anterior
ALS:	Amyotrofik lateral skleroz
BA:	Baziler arter
CAT:	Katalaz
CCA:	Common cerebral arter
CK:	Kreatin kinaz
CK-BB:	Kreatin kinaz BB
cAMP:	Siklik 3-5 adenzin monofosfat
cGMP:	Siklik guanozin monofosfat
DAM:	Deneysel Araştırmalar Merkezi
GsH-PX:	Glutasyon peroksidaz
İKB:	İntrakraniyal basınç
I/R:	İskemi / reperfüzyon
LDH:	Laktat dehidrogenaz
MDA:	Malondialdehid
MCA:	Middle serebral arter
MS:	Multiple skleroz
Mino:	Minosiklin
NSE:	Nöron spesifik enolaz
PCA:	Posterior serebral arter
SKA:	Serebral kan akımı
SPB:	Serebral perfüzyon basıncı
SVO:	Serebrovasküler olay
TBI:	Travmatik beyin hasarı

TEŞEKKÜR

Mustafa Kemal Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, birikim, destek ve cerrahinin inceliklerini benimle paylaşan hocalarım Sayın Prof. Dr. Nebi YILMAZ, Sayın Doç.Dr. Yurdal Serarslan, tez danışmanım Sayın Yard.Doç.Dr. Mustafa ARAS, Sayın Yard.Doç.Dr. Murat ALTAŞ, Sayın Yard.Doç.Dr. Seyit Kağan BAŞARSLAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırma projemin biyokimyasal analiz ve değerlendirmeleriyle ilgili olarak Sayın Doç. Dr.Hasan Öztürk, Sayın Uzm. Dr. K.Türker Ulutaş'a; patolojik analiz ve değerlendirmelerle ilgili olarak Sayın Yard. Doç.Dr. Tümay Özgür ve Sayın Dr. Serhat Toprak'a katkı ve yardımlarından dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzun yıllar boyunca kliniğimizde zor ve yorucu günlerde birlikte çalıştığımız meslektaşlarıma; başta servis sorumlu hemşiresi Hemş. Özlen Karenfil olmak üzere tüm servis ve yoğun bakım hemşirelerimize ve personellerimize sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her alanında yanımda olan babam Niyazi URFALI, annem Gülay URFALI ve kardeşim Uzm.Dr. Senem URFALI'ya minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Boran URFALI

Hatay - Nisan 2013

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada ratlarda serebral iskemi-reperfüzyona bağlı gelişen hasara minosiklinin etkileri ve etkinliği araştırılmasını amaçladık.

Yöntem: Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda M.K.Ü. Deneysel Araştırmalar Merkezi'nin (DAM) laboratuvar imkanları kullanılarak 200-250 gram 24 adet erkek Wistar Albino sıçan 3 gruba ayrılarak, anterior servikal diseksiyonla bilateral a. carotis communis'ler ortaya konduktan sonra n. vaguslar ekarte edilerek uygulanan oklüzyonunun ardında iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturularak gerçekleştirildi. Minosiklin-iskemi/reperfüzyon grubuna iskemi öncesi 48. Saat, 24. Saat ve 1. Saatte minosiklin 90 mg./kg. p.o. uygulandı, tanımlanan modele uygun iskemi-reperfüzyon hasarı yapıldı. Reperfüzyon sonrası alınan kan ve beyin dokusunda MDA, SOD, GSH-PX, CAT düzeyleri ve kanda CK, CK-BB, LDH, NSE, protein S100b düzeyleri ölçüldü ve histopatolojik değişiklikler incelendi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS v15 programı kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Yapılan histopatolojik değerlendirmelerde ışık mikroskobu görüntülerinde iskemi-reperfüzyon+minosiklin grubunda iskemi-reperfüzyon grubuna göre dejenerasyon bulgularında kısmi düzelme olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel analizde, iskemi-reperfüzyon+minosiklin grubunda iskemi-reperfüzyon grubuna göre vakuolizasyonda ($p<0,001$), konjesyonda ($p<0,05$), eozinofilik dejenerasyonda ($p<0,001$) düzeylerinde anlamlı düzelme saptandı. Biyokimyasal değerlerin istatistiksel analizinde iskemi-reperfüzyon+minosiklin grubunda iskemi-reperfüzyon grubuna göre MDA ($p<0,001$), NO ($p<0,05$), CK ($p<0,05$), CK-MB ($p<0,05$) değerlerinde anlamlı fark saptandı.

Sonuçlar: Minosiklinin beyin iskemi-reperfüzyon hasarı üzerinde etkilerinin incelendiği bu çalışmada minosiklin uygulanan grupta kısmi düzelme bulguları saptandı. Minosiklinin beyin iskemi-reperfüzyon hasarında etkilerinin çoklu merkezli çalışmalarla incelenmesi ve standardize edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin, iskemi, reperfüzyon, minosiklin, MDA, NSE, protein S100b.



ABSTRACT

Assessment of The Effects of Minocycline on Brain Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Objective: It is aimed to assess the effects and effectiveness of minocycline on injury developed by cerebral ischemia-reperfusion in rats in the present study.

Material and Methods: This study was performed at Mustafa Kemal University Faculty of Medicine, Department of Brain and Nerve Surgery, using the laboratory facility of Mustafa Kemal University Experimental Research Center, and after dividing 24 male Wistar Albino rats, weighing 200 to 250 grams, into 3 groups, following exhibition of common carotid artery bilaterally by anterior cervical dissection and exclusion of vagus nerve, ischemia-reperfusion injury was performed by occlusion. Minocycline 90 mg/kg p.o. was administered to rats in ischemia-reperfusion group at 48th, 24th, and 1st hours pre-ischemia, and ischemia-reperfusion was applied as appropriate to the model described. Following reperfusion MDA, SOD, GSH-PX, CAT levels in blood and brain tissue, and CK, CK-BB, LDH, NSE, protein S100b levels in blood were measured and the histopathological changes were monitored. Data were statistically assessed using SPSS v15.

Results: Regarding histopathological evaluation, symptoms of degeneration were partially improved in the ischemia-reperfusion+minocycline group when compared to the ischemia-reperfusion sole group. When analyzed statistically, significant improvement in vacuolization ($p<0,001$), congestion ($p<0,05$), and eosinophilic degeneration ($p<0,001$) levels were found in the ischemia-reperfusion+minocycline group when compared to the ischemia-reperfusion sole group. In the statistical analysis of biochemical parameters, significant differences in MDA ($p<0,001$), NO

($p<0,05$), CK ($p<0,05$), CK-MB ($p<0,05$) levels in the ischemia-reperfusion+minocycline group when compared to the ischemia-reperfusion sole group.

Conclusion: Partial improvement was found in minocycline applied group in this study where the effects of minocycline on brain ischemia-reperfusion injury have been studied. The effects of minocycline on brain ischemia-reperfusion injury need to be standardized and studied in multi-center trials.

Key words: Brain, ischemia, reperfusion, minocycline, MDA, NSE, protein S100b.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral iskemi ve bunun ardından gerçekleşen reperfüzyona bağlı meydana gelen beyin hasarı ve sonuçları; modern nöroşirurji, nöroloji ve sinirbilim ile ilgilenen bilim adamlarının önemli sorunlarından biridir.

Serebral iskemi beyin kan akımında azalma veya kesilme gibi değişikliklere bağlı olarak enerji kaynakları ve oksijen desteğinin yetersizleşmesi ile başlayan ve nöronal dejenerasyon ve ölümle sonuçlanan bir olaylar zinciridir (1, 2) .

İskemi; kardiyak arrest, inme (stroke), subaraknoid kanama, travmatik beyin yaralanması (TBI) gibi birçok klinik tabloda ortaya çıkabilen ve sık gözlenen bir tablodur. Buna bağlı nedenlerle serebral iskemi erişkinlerdeki en sık mortalite ve morbidite nedenlerindendir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre inme; serebral işlevlerin global veya fokal bozulmasına bağlı gelişen klinik bulguların 24 saat veya daha uzun sürmesi veya ölüm gelişmesidir. Beyin damar hastalıklarının yaklaşık %85'ini iskemiye bağlı gelişen tablolar oluşturmaktadır (3).

İskemi etyolojisi ile ilgili olarak fokal veya global iskemi şeklinde gözlenir. Fokal iskemi genellikle orta serebral arterin embolik oklüzyonu ile ortaya çıkmasına rağmen subaraknoid kanama, kafa travması gibi nedenlere bağlı olarak da gelişebilir. Global iskeminin gelişimi ise kardiyak arrest sonucu gerçekleşir (4). Global serebral iskemide serebral kan akımı mevcut olmamasına rağmen fokal serebral iskemide kollateral dolanımlar sayesinde düşük düzeylerde rezidüel kan akımı potansiyeli mevcuttur. Fokal serebral iskemideki rezidüel perfüzyon hücre membran devamlılığını

sağlar ve bu sayede düşük düzeyde metabolik aktivitenin devam ettirilebilmesine yardımcı olur (5). Fokal serebral iskemideki lezyon santral fokus ve perifokal alan adlı iki bölümden oluşur. Santral fokus reperfüzyonun hızla yapılmadığı durumda oluşan infarkt alanıdır; dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasarın olduğu, lezyonun en yoğun olduğu bölgedir. Perifokal alan ise elektiriksel aktivitesi sessiz, iyon pompaları halen intakt olan bölgedir. Reperfüzyon sağlanması, nöroprotektif ajanlarla desteklenmesi durumunda kurtarılabilmek olası olduğu alan perifokal alandır (6).

Tanımlanmış en eski serebral iskemi olgusunun; Gull'un 1859'daki yazısında tanımladığı; 30 yaşında, yürürken aniden sol eli ile başını tutan ve başının ağrıdığını söyleyen bir kadın olduğu düşünülebilir. Bu olguda hasta hospitalize edildiğinde sağ kolunda hafif paralizi olduğu, kaslarının flasid olduğu ve sağ bacağına da aynı kliniğin olduğu raporlanmaktadır. Hasta daha sonra düzelmeye başlamış, 3. günü yemek yiyebilmiş, 4. gün bazı kelimeleri söyleyebilmeye başlamış ancak 5. gün aniden kötüleşerek pupilleri fiks dilate olmuş ve eksitus olmuş. Otopside sol hemisferde masif yumuşama ile birlikte sol Sylvian fissürde subaraknoid kanama (SAK) ve a.cerebri mediada (MCA) biri patlamış olan iki anevrizma raporlanmış (7).

Serebral iskemi-reperfüzyon hasarının temeli iskemi ve buna bağlı nöronal doku hasarı ile birlikte reperfüzyon sırasında ve sonrasında açığa çıkan kimyasal mediatör ve maddelere dayanmaktadır. Beyin dokusu tarafından verilmiş olan bu reaksiyonların parenkim hasarında temel rol oynadığı düşünülmektedir.

Beyin kan akımının azalmasına bağlı birçok biyokimyasal ve immünolojik süreç; bu süreç içinde de moleküller arasında ve immün hücreler arasında izlenen etkileşimler serebral iskemi fizyopatogenezinde rol almaktadır. Eksitotoksisite, nitrik oksit etkileri, iyon değişiklikleri, serbest radikaller, iskemi sonrası gerçekleşen inflamatuvar reaksiyonlar bu kaskaddaki başlıca aktörlerdir (8).

Serbest radikaller lipid peroksidasyonu ile hücre membranlarını doğrudan hasarlayan potent okside edici ve indirgeyici ajanlardır (9). Malondialdehid (MDA) gibi lipid peroksidasyonu biyoürünlerinin oluşumu veya endojen koruyucu moleküllerin tüketim hızlarının oranı serebral iskemik hasarla etkilenen dokunun

gösterilmesinde önemlidir (10). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi endojen antioksidanlar oksidatif hasara karşı korunmada önemli moleküllerdir (11).

Literatürde serebral iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır ve bu konu ile ilgili birçok ajan ve grup incelenmiştir. Bu ajanlardan bir tanesi de minosiklidir. Minosiklin yüksek lipofilik özelliğe sahip, kan-beyin bariyerini geçebilen, yarı sentetik, uzun etkili, ikinci kuşak bir tetrasiklidir. Minosiklinin epilepsi, Huntington Hastalığı, Parkinson Hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS), multiple skleroz (MS), fokal ve global serebral iskemi, travmatik beyin hasarı, omurilik zedelenmesi gibi hastalık modellerinde nöroprotektif etkinlik gösterdiği düşünülmektedir (12).

Minosiklinin mikrogliya aktivasyonunu; immün hücre aktivasyonunu; ard arda gelen sitokin, kemokin, inflamasyonun lipid mediyatörleri, matriks metalloproteinaz ve nitrik oksit (NO) salınımını modüle ederek potent anti-inflamatuvar etki gösterdiği gösterilmiştir (13, 14).

Literatürdeki bilgilerin ışığında bu çalışmada ratlarda serebral iskemi-reperfüzyona bağlı gelişen hasara minosiklinin etkileri ve etkinliği araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

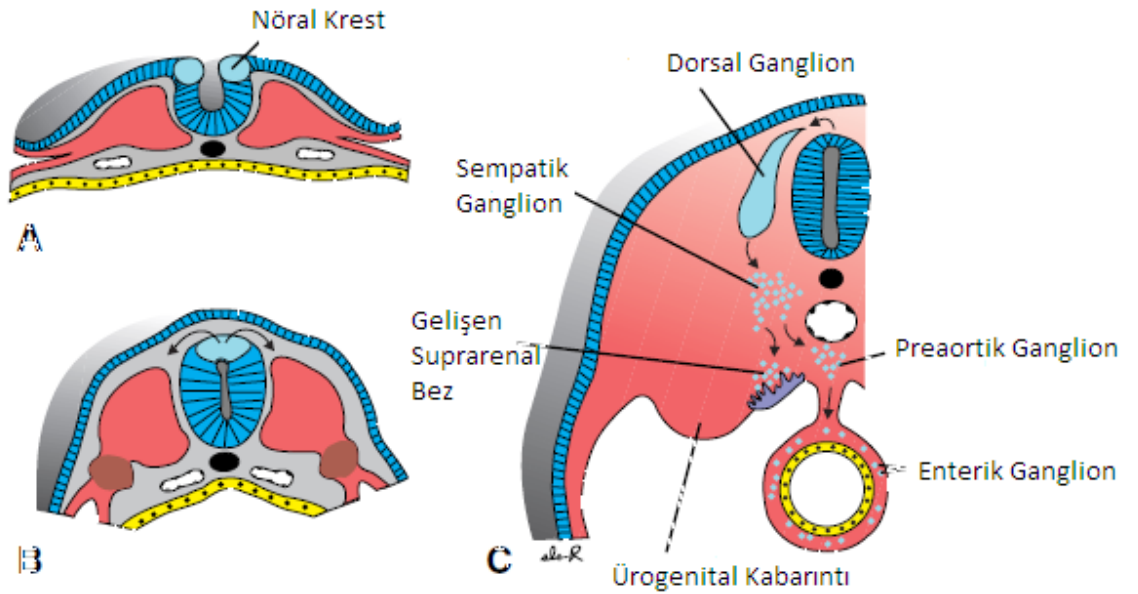
2.1.Beyin Embriyolojisi

Merkezi sinir sistemi üçüncü haftanın başında primitif nodun middorsal bölgesinin önünde ektodermin kalınlaşması, nöral plaka, ile gözlenmeye başlar (Şekil 1) (15).

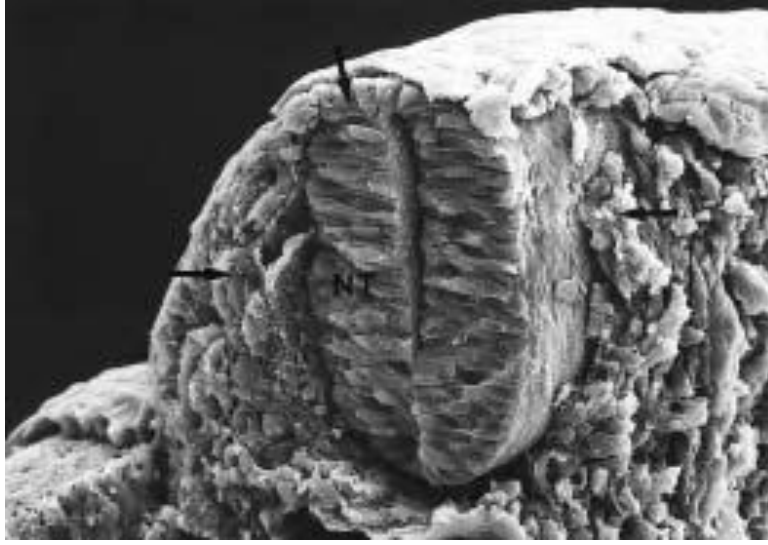


Resim 1: Yirmi günlük fare embriyosunun elektron mikroskobu altındaki görüntüsü. F: Forebrain, M: Midbrain, H: Hindbrain (15).

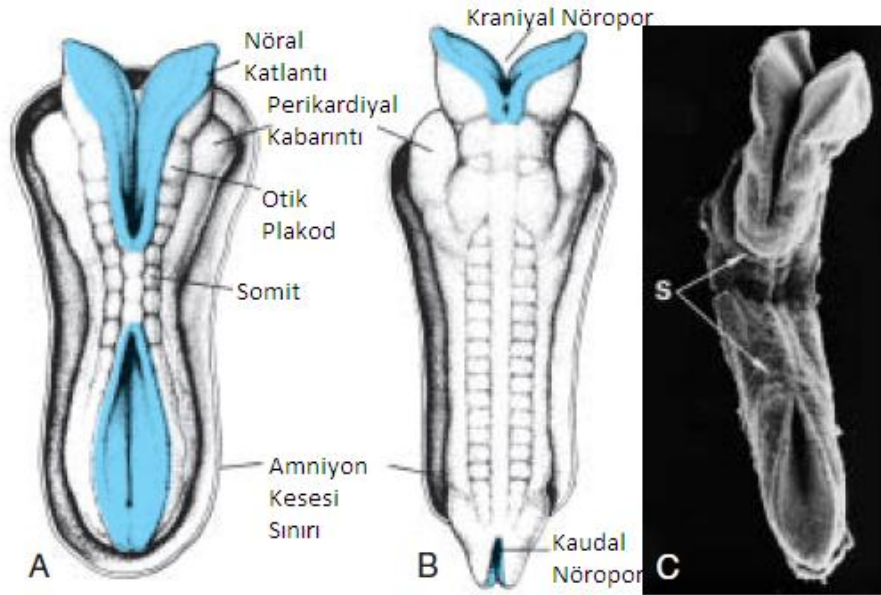
Gelişimin ilerlemesi ile birlikte nöral katlantılar yükselmeye ve orta hatta nöral tüpü meydana getirmek için birbirine doğru yaklaşmaya başlarlar (Şekil 2, Şekil 3). Nöral katlantılar servikal bölgede birbirine temas ettiğinde füzyon başlar ve hem sefalik hem de kaudal yöne doğru devam eder. Füzyon başladığında nöral tüpün açık uçları altta yatan amniyotik kavite ile ilişkide olan kranyal ve kaudal nöroporları meydana getirir (Şekil 4). Kraniyal nöroporun kapanması kraniyalde servikal bölgedeki başlangıç kapanma alanından ve daha sonra oluşacak olan forebrain alanından başlar (Şekil 4. A). Bu alan nöral tüpün kraniyalde kapanmasına ve kaudalde de servikal alandan kaynaklanan kapanmaya eşlik eder. Kraniyal nöroporun en son kapanması 18 ile 20 somit evresinde (somite stage) (25. gün) , kaudal nöroporun kapanması ise bundan yaklaşık 2 gün sonra gerçekleşir.



Şekil 1: A-C. Embriyodaki nöral oluk, nöral tüp ve nöral krest gösteren transvers kesitler. Nöral krest hücreleri nöral katlantıların sınırlarından migrasyona uğramakta ve spinal ve sensoriyal ganglionlara gelişmektedir (15).



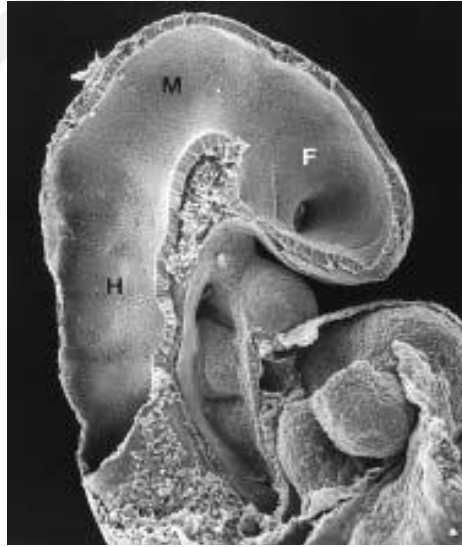
Resim 2: Dorsal bölgeden migrasyona uğrayan nöral tüp (NT) ve nöral krest (oklar) hücreleri (15).



Şekil 2: A. Yaklaşık 22. Günündeki insan embriyosunun dorsal görünümü. Nöral tüpün her iki yanında belirgin yedi somit gözlenmektedir. B. Yaklaşık 23. Günündeki insan embriyosunun dorsal görünümü. Sinir sistemi kranial ve kaudal nöroporlar aracılığı ile amniyotik kavite ile bağlantı halinde. C. A.'daki ile benzer evredeki fare embriyosunun elektron mikroskobu altındaki görüntüsü. S:Somitler (15).

Nöral tüpün sefalik sonunun üç dilatasyonu vardır ve bunlar primer beyin vezikülleridir: (A) prozensefalon veya forebrain; (B) mezensefalon veya midbrain; (C) rombensefalon veya hindbrain (Şekil 5). Bu yapı iki fleksura oluşturur: (a)

rombensefalon ile spinal kord bileşkesindeki servikal fleksura; (b) mezensefalon bölgesindeki sefalik fleksura (Şekil 5). Embriyo 5 haftalık olduğunda prozensefalon 2 parçadan oluşur: (a) orta kısımdan ve lateral iki cepten oluşan telensefalon, primitif serebral hemisferler; (b) optik veziküllerin gelişimi ile karakterize diensefalon (Şekil 6). Bu dönemde rombensefalon istmus adlı mezensefalon ile rombensefalonu birbirinden ayıran derin oluk da gözlenir. Rombensefalon iki parçadan oluşur: (A) daha sonra pons ve serebellumu oluşturacak olan metensefalon; (B) miyelsefalon. Bu iki kısım arasındaki dallar pontin fleksur olarak adlandırılır (Şekil 6). Spinal kordun lümeni olan santral kanal beyin vezikülleri ile devam eder. Rombensefalonun kavitesi dördüncü ventrikül, diensefalonun kavitesi üçüncü ventrikül, serebral hemisferlerin kaviteleri de lateral ventrikülleri oluşturur. Mezensefalonun lümeni üçüncü ve dördüncü ventrikülleri birbirine bağlar, darlaştığı yer de aqueductus Sylvius'u oluşturur. Lateral ventriküller de interventriküler foramen Monro ile birbirlerine bağlantılıdır (Şekil 6) (15).

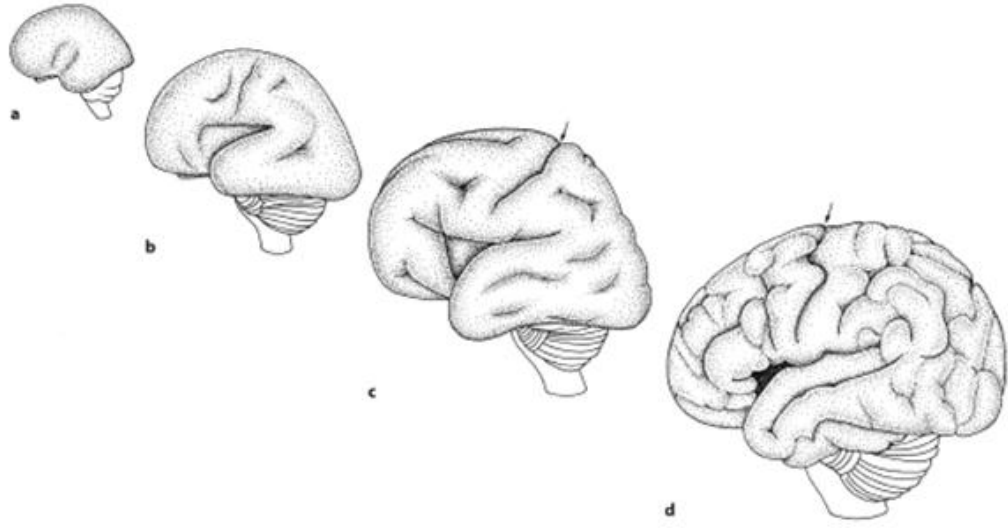


Resim 3: İnsan embriyosunun yaklaşık 27. Gününe denk gelen fare embriyosunun elektron mikroskopundaki sagittal görüntüsü. Üç beyin vezikülü de gözlenmektedir. F: Forebrain, M: Midbrain, H: Hindbrain (15).

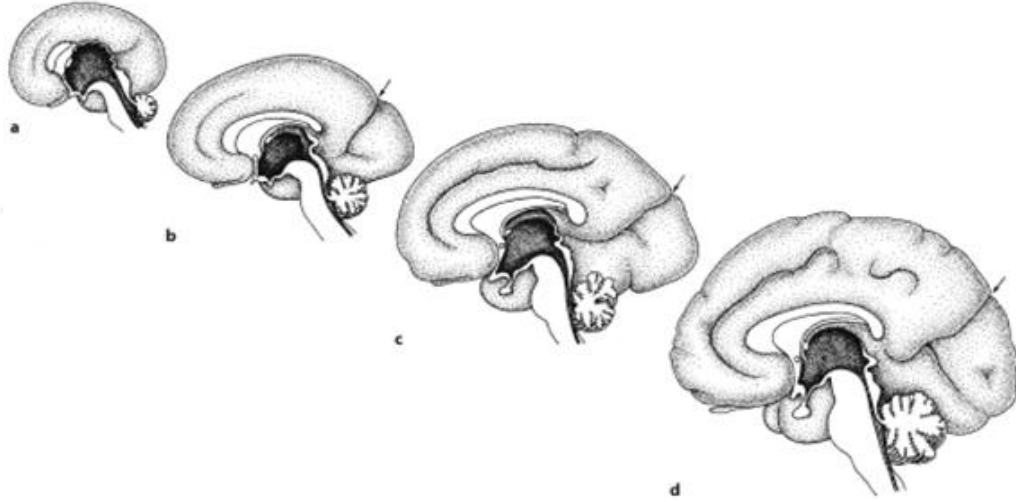


Resim 4: İnsan embriyosunun yaklaşık 32. Gününe denk gelen fare embriyosunun elektron mikroskopundaki sagittal görüntüsü. Üç beyin vezikülü de telensefalona (T), diensefalona (D), mezensefalona (M), metensefalona (Mt) ve miyelensefalona (My) ayrılmış. Yıldız işareti telensefalonda dışarı cepleşmesini; ok işareti rombensefalik istmusu; okbaşıları 4. Ventrikülün tavanını; o ise optik stalkı göstermektedir (15).

Serebral korteksin gelişimi ve kortikal nöronların proliferasyonu ve migrasyonu büyük ölçüde fetal periyotta gerçekleşir. Her hemisfer önce kaudal yönde büyür, daha sonra ventral ve rostral yönde bükülmeye, eğilmeye başlar. Bu şekilde temporal loblar oluşur. Kaudat nükleus, amigdala, hipokampus, lateral ventriküller de aynı C-şekilli yolla olur. Sulcus ve gyrusların karmaşık yapısı da fetal periyotta gerçekleşir. Dördüncü aydan sonra beynin lateral yüzeyinde sulkus lateralis ve sulkus sentralis tanımlanmaya başlar. Prefrontal korteksin gelişimine bağlı olarak sulkus sentralis kaudal yöne doğru ilerler. Medial yüzeyde ilk olarak parieto-okspital ve singulat girus ortaya çıkar, ardından kalkarin ve sentral sulkuslar gelişir. Sağ hemisferde sulkus ve girus formasyonu sol hemisferden önce gerçekleşir. Lateral ventrikülün pleksus koroideusu telensefalik vezikülün alt kısmında oluşur (16).



Şekil 3: Gelişmekte olan insan beyninin lateral görüntüleri, a. 4. Gestasyonel ayda, b. 6. Gestasyonel ayda, c. 8. Gestasyonel ayda, d. Neonatal dönemde. Ok santral sulkusu işaret etmektedir (16).

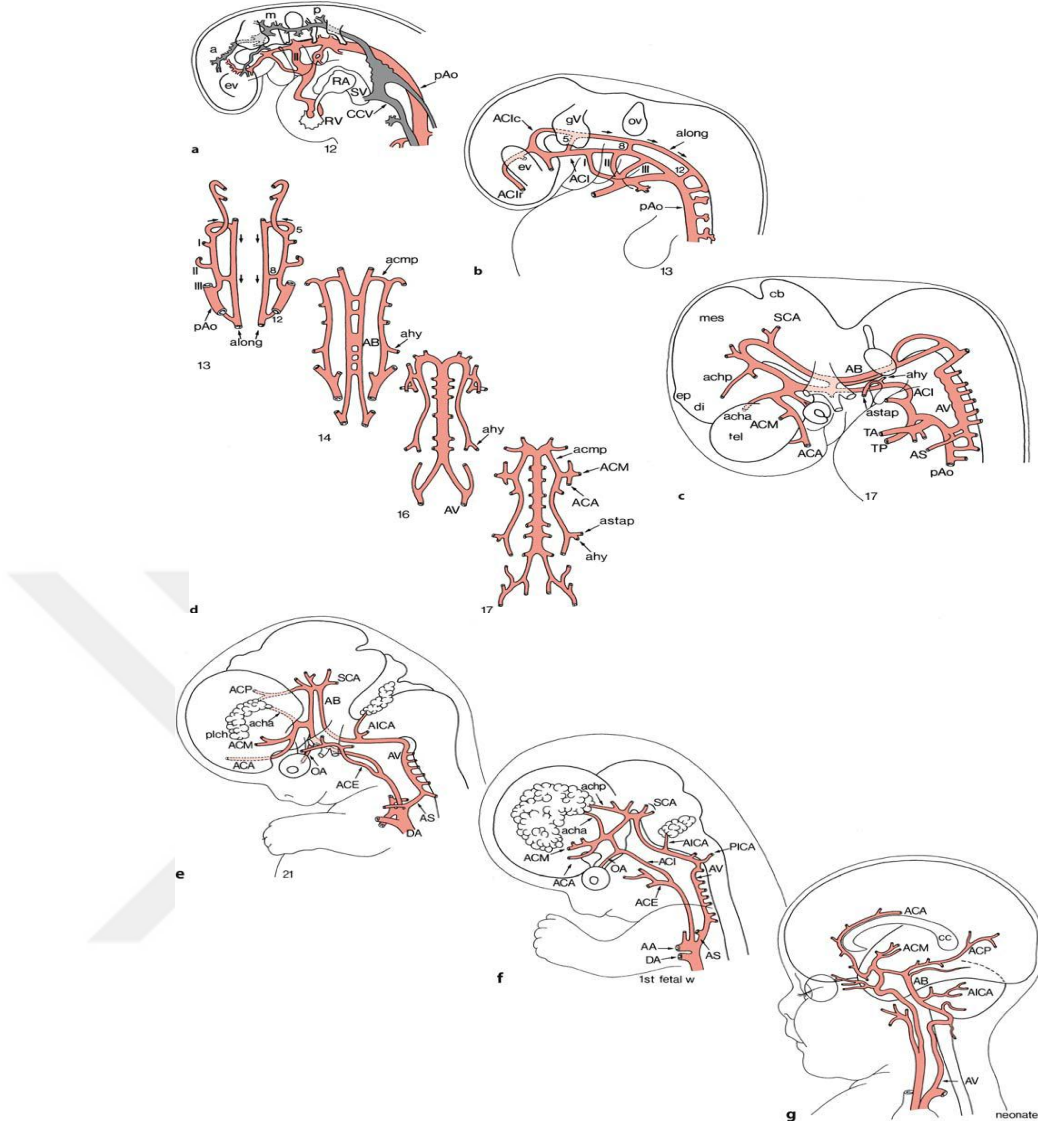


Şekil 4: Gelişmekte olan insan beyninin medial görüntüleri, a. 4. Gestasyonel ayda, b. 6. Gestasyonel ayda, c. 8. Gestasyonel ayda, d. Neonatal dönemde. Oklar pariyeto-oksipital sulkusu işaret etmektedir (16) .

Beynin kanlanması bir çift karotid arter ve vertebral arterin Willis poligonunda bağlanması ile olur. Nöral tüpün kapanması sırasında primordiyal endotelial kan içeren kanallar kurulur. Bu kanallardan tüm diğer damarlar, arterler, venler ve kapillerler farklılırlar. Carnegie evre (stage) 12'de; ana venöz pleksuslar,

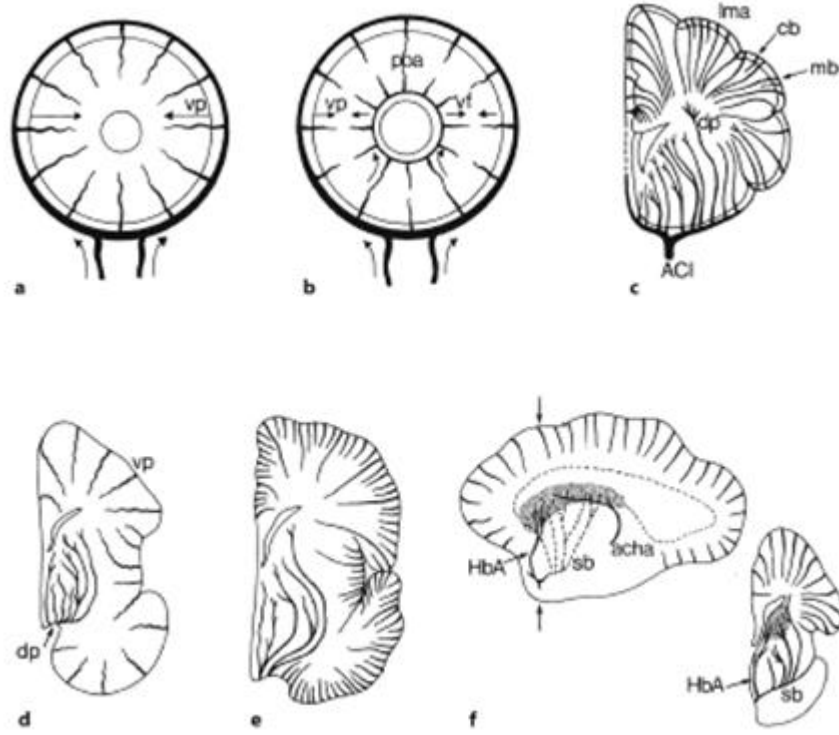
ana ven ve üç aortik ark oluşur. Stage 11-13'de internal karotidler gelişir ve bunu posterior kommunikan arterler izler. Stage 14'de internal karotidlerin kaudal dalları, stage 16'da vertebral arterler, stage 17'de ana serebral arterler ve sonunda anterior kommunikan arter oluşur ve tüm bunların sonunda Willis poligonu tamamlanır. Bilateral olarak longitudinal arterler stage 13'de oluşur ve temporary trigeminal, otik ve hipoglossal arterler ile internal karotidler aracılığı ile birbirine bağlanır. İlk başta posterior kommunikan arter beynin ana kan sağlayıcısıdır. Anastomotik kanallar iki longitudinal arteri birbirine bağlar bunun sonucu olarak basiller arter formasyonu başlar. Temporary arterler aşamalı olarak elimine edilir, fakat her biri persistant olarak kalabilir (16).





Şekil 5: Carnegie evre (stage) 12'den neonatal döneme kadar insan beyninin damarsal gelişimine bakış. Arterler kırmızı, venler gri gösterilmiştir. *a* anterior kapital pleksus, *AA* aortik ark, *AB* a. basilaris, *ACA* a. serebri anterior, *ACE* a. karotis eksterna, *acha* anterior koroidal arter, *achp* posterior koroidal arter, *ACI* a. karotis interna, *ACIc* a.karotis internanın kaudal dalı, *ACIr* a.karotis internanın rostral dalı, *ACM* a.serebri media, *acmp* a. kommunikan posterior, *ACP* a. serebri posterior, *ahy* hiyoid arter, *AICA* anterior inferior serebellar arter, *along* a. longitudinalis, *AS* a. subklavia, *astap* a. stapediya, *AV* a. vertebralis, *cb* serebellum, *cc* korpus kallozum, *CCV* v.cardinalis communis, *DA* duktus arteriyosus, *di* diensefalon, *ep* epifiz, *ev* göz vezikülü, *gV* trigeminal gangliyon, *m* middle kapital pleksus, *mes* mezensefalon, *OA* oftalmik arter, *ov* otik vezikül, *p* posterior kapital pleksus, *pAo* posterior aorta, *PICA* posterior inferior serebellar arter, *plch* pleksus koroides, *RA* sağ atrium, *RV* sağ ventrikül , *SCA* superior serebellar arter, *SV* sinus venozus, *TA* trunkus arteriyosus, *tel* telensefalon, *TP* trunkus pulmonalis, *I-III* aortik dallar, *5, 8, 12* temporary trigeminal, otik ve hipoglossal arterler (16).

Primitif trigeminal arter primitif karotid-basiller anastomozlardan yetişkin çağına en sık kalan persistant arterdir (%0.1-1). Serebral hemisferler seviyesinde kapillerler 5. Hafta civarında gözlenir (beyin sapında daha erken olabilir). Stage 16'da (5.hafta) son arterlerin bazıları bulunur ve bunlar son yapılarına doğru transforme olmaya başlar. Embriyonik periyodun sonunda leptomeningeal arterlerin anular ağı her middle serebral arterden yükselir ve gelişen hemisferlerin üzerinde uzanır. Vertebral ve baziler arterlerden köken alan benzer meningeal dallar beyin sapını ve serebellumu sarar. Aşamalı olarak muskularize olan leptomeningeal arter dalları beyin içine doğru gelişirler. Hem supratentoryal hem de infratentoryal paramedian, kısa sirkumferensiyal ve uzun sirkumferensiyal arterler tanımlanabilir. Gestasyonun 7. haftasında telensefalonu penetre eden damarlar gestasyonun 12. haftasında subventriküler pleksusu oluşturur ve aşamalı olarak muskularize olur. Anterior serebral arterin paramedian dalı serebral parenkimi penetre etmeden önce kısa bir seyre sahiptir. "kısa sirkumferensiyal arterler" (striat arter gibi) biraz daha uzun bir seyre sahiptir. "uzun sirkumferensiyal arterler" serebral hemisferlerin dorsal yüzeyine ulaşır. Gestasyonun 16. haftasında Willis poligonuna katılan anterior, middle ve posterior serebral arterler oluşmuştur. İlerleyen fetal periyodda rölatif olarak basit leptomeningeal arterler artar (büyüklük, dal sayısı ve tortuosite olarak) ve dallanma patternleri gestasyonun 28. haftasında tamamlanır. Leptomeningeal perforan dallar kortikal, medullar, striat dallar olarak serebral parankime geçerler. Kortikal damarlar korteksi kısa dallarla besler. Bununla beraber medullar dallar altta yatan beyaz cevheri besler. Striat dallar beyine anterior perforat substans yoluyla penetre ederler ve bazal ganglialar ve internal kapsülü beslerler. Kortikal ve medüller dallar serebrumun periferi boyunca koni şekilli alanları besler (ventrikülopetal arterler). Striat dallar ventriküle yakındır ve serebrumun daha merkezi kısmını besler.



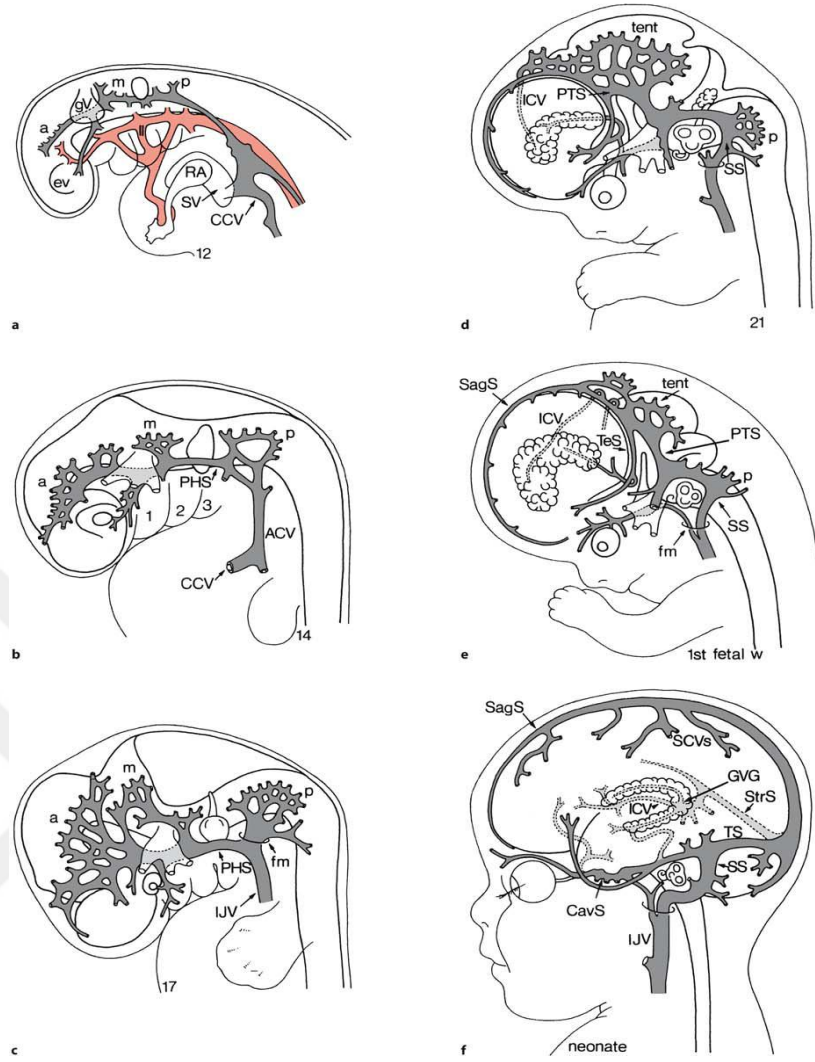
Şekil 6: Serebral damarların gelişimi. Beyin leptomeningeal arter sistemi ile sarılmıştır. vp: ventrikülopetal arterler, vf: ventrikülofugal arterler, dp: derin penetre edici damarlar, acha: anterior koroidal arter, ACI: internal karotid arter, cb: kortikal dallar, HbA: Heubner arteri, Ima: leptomeningeal arter, mb: meduller dallar, pba: periventriküler sınır alan, sb: middle serebral arterin striat dalları (16).

Tela koroideanın dalları ile birlikte striat dallar “ventrikülofugal” arterleri verir; bu damarlar ventriküler zonu veya germinal matriksi besler. Bazı görüşlere göre merkezi kısımlar derin penetran arterler ile beslenir. Midgestasyonda strial arterlerin bazal sonlarında düz kaslar bulunur ve ikinci trimesterin sonuna doğru kaudate nükleusun içine doğru uzanan damarlara doğru da uzanır. Aşamalı olarak intrakortikal damarlar gelişir. 13. Haftadan 15. haftaya kadar yan dalları olmadan radial arterler korteks boyunca uzanır. 20. Gestasyonel haftada horizontal yan dallar ve rekurren kollaterallar ortaya çıkar ve 27. haftadan terme kadar daha kısa radial arterlerin sayısı artar. İntrakortikal kapillerlerin büyümesi doğumdan sonra da devam eder. Fetal beyinde 17. haftaya kadar kapiller yoğunluğu ventriküler zonda kortikal plate’den çok daha fazladır. 25.Haftadan sonra kortikal alanlarda artmış vaskülarizasyon olur. Gestasyonun 24. haftasında basal gangliaların büyük kısmı ve

internal kapsul prominent Heubner arteri ile beslenir (anterior serebral arterden yükselir). Ventriküler yataktaki kapiller yatak ana olarak Heubner'in arteri veya middle serebral arterden köken alan lateral striat arterin terminal dallar ile beslenir. Gelişim bu basamaklarında korteks ve altında uzanan beyaz cevher daha zayıf vaskülarizedir. Zamanla middle cerebral arter ile beslenen alan anterior ve posterior serebral arterler ile beslenen alanlara göre predominant hale gelir. Gestasyonun 16. haftasında erken arteriyel anastomozlar oluşur. Middle ve anterior serebral arterler arasındaki anastomoz hattı beynin konveksitesinden superior saggital sinuse doğru uzanır. Middle ve posterior serebral arterler arasındaki anastomoz hattı beynin bazal yanında uzanır. Gestasyonun 32-34. haftalarında ventriküler zon içeri doğru kıvrımlanır ve serebral korteks kompleks artmış vasküler desteği ile kompleks girus yapısına ulaşır. Ventriküler zon kapillerleri kaudat nukleus kapillerleri ile karışır ve Heubner arterinin beslediği alan kaudate nukleusun küçük bir mediyal parçasına indirgenir. 3. Trimesterin sonuna doğru serebral dolaşım dengesi sentral - ventriküler zon oriyente dolaşımdan serebral korteks ve beyaz cevherde predominant dolaşıma doğru yön değiştirir. Serebral sirkülasyon yapısındaki bu değişiklikler gelişen insan beynindeki hipoksik/iskemik lezyonların dağılımı ve patogenezisinde ana önemli faktördür. Serebrovasküler dansite bölgesel metabolik ihtiyaç ile uyumludur. Özellikle hızlı serebral gelişim, miyelinasyon, differensiyasyonun postnatal periyodunda vertebrobaziler ve karotid sistemdeki serebrovasküler iletim beyin ağırlığından daha yavaş ilerler. Normal gelişimin parçası olarak çoğu immatür insan serebral arterleri damar bifurkasyonlarının yakınındaki bölgelerde zayıflamış alanlara sahiptir. Bu zayıflamış alanlar maturasyon sırasında düz kas depozisyonu yolu ile güçlendirilir ancak erken postnatal gelişim boyunca artmış derecede savunmasız alanlar olarak değerlendirilebilir. Genç premature infantlarda (22-30 hafta) germinal zon ile periventriküler zon damarları ve perforan ventrikülopetal damarlar özellikle perinatal asfiksiye karşı savunmasızdır. Bu damarların hasarlanması fokal hemorajik lezyonlara neden olur. Daha ileri yaşlı premature infantlarda (30-34 hafta) fetal beyaz madde hipoksik-iskemik beyin hasarına özellikle daha savunmasızdır ki bu durum periventriküler lökomalaziye (PVL), infarktlara (nekroz) ve kavitasyonlara neden olur.

Dural pleksuslar prekardinal venlerle bağlantılıdır ve beynin çevresindeki çeşitli dural sinüsleri oluşturmak üzere modifiye olurlar. Kesin (son) venöz kanallar primitif vasküler ağdan yükselirler (arterlerden daha sonra). Uzun periyotta değerlendirildiğinde çevrenin değişen ihtiyaçlarını sağlayabilmek için büyük bir ayarlama gerekmektedir ve bunun için de komplike venöz anastomozlar essansiyeldir. Altı ana evrede değerlendirilir. Padgett'in Venöz Stage 1'i: Ana venöz pleksus ve ana ven oluşur. Padgett'in Venöz Stage 2'si: Üç rölatif kalıcı dural kök (anterior, middle, posterior) anterior kardinal ven ile devamlılık gösteren primer baş sinüsüne dökülür (capital veya "head" veni). Padgett'in Venöz Stage 3 ve 4 boyunca dural venöz kanallar serebral hemisferler ve serebellar taslaklar genişler ve otik vezikül de genişledikçe daha laterale doğru uzanırlar. "Head" sinüs ve primitif internal jugular ven de bu gelişmeler sırasında laterale migre olur. Padgett'in Venöz Stage 5'i ile "head" sinüs sekonder anastomoz ile yer değiştirir (sigmoid sinus). Daha da ilerledikçe daha kranial primitive transverse sinüs oluşur. Padgett'in Venöz Stage 6'sı sırasında eksternal juguler sistem oluşur.

Medulla dışındaki beynin çoğu parçası sigmoid sinus ile primitif transvers sinüsün bileşkesine dökülür. Bu arada intraserebral drenajın "Galenik sistemi" ganglionik eminenslerin akselere büyümesinin sonucu olarak ortaya çıkar. Sonraki venöz değişiklikler büyük oranda serebral ve serebellar hemisferlerin ekspansiyonuna ve kafatasının rölatif olarak geç ossifikasyonuna bağlıdır. Galen ven malformasyonu en sık serebral venöz sistem malformasyonlarından birisidir (16) .



Şekil 7: Carnegie evre (stage) 12'den neonatal döneme kadar insan beyninin venöz sistem gelişimine bakış. Venler gri, erken arteriyel yapılar kırmızı gösterilmiştir. *a* anterior kapital pleksus, *ACV* anterior kardinal ven, *CavS* kavernöz sinus, *CCV* kommon kardinal ven, *ev* göz vezikülü, *m* foramen magnum, *GVG* Galen'in büyük veni, *ICV* internal serebral ven, *IJV* internal jugular ven, *m* middle kapital pleksus, *p* posterior kapital pleksus, *PHS* primer kafa sinüsü, *PTS* primitif transvers sinüs, *RA* sağ atrium, *SagS* sagittal sinüs, *SCVs* superior serebral ven, *SS* sigmoid sinüs, *StrS* straight sinüs, *SV* sinus venozus, *tent* tentoriyal pleksus, *TeS* tentorial sinüs, *TS* transverse sinüs, *II* ikinci aortik dal, *I*, *2*, *3* pharingeal arklar (16) .

2.2 Beynin Vasküler Anatomisi

Beynin kanlanması her iki internal karotid arterler ve vertebral arterlerden oluşan bir sistem tarafından sağlanır.

2.2.1. A.Carotis Interna (ICA):

ICA bilateral olarak a.carotis communisden kaynaklanır. Eksternal karotid artere göre daha lateralde ve posteriorda seyrederek. Bir karotid arterin akut olarak oklude olması insanların %15-20'sinde inme (stroke) nedenidir. Karotid sifon kavernoöz ICA'nın posterior eğiminden başlar ve ICA bifurkasyonunda sonlanır; kavernoöz, oftalmik ve kommunikan segmentleri birleştirir. Yedi segmenti vardır.

Servikal (C1) segmenti; karotid bifurkasyonundan başlar, v.jugularis interna ve n.vagus ile birlikte karotid kılıf içinde seyrederek. Postgangliyonik sempatik sinirlerle sarıdır. Eksternal karotidin posterior ve medialinde uzanır. Petroz kemiğin karotid kanalına girerken sonlanır. C1 dalı vermez.

Petroz (C2) segmenti; postgangliyonik sempatik sinirlerle sarıdır. Foramen lacerumun posterior sınırında sonlanır. Vertikal segment, posterior loop ve horizontal segment olmak üzere üç segmenti vardır.

Lacerum (C3) segmenti; ICA foramen lacerumun üzerinden lateral loopu yaparak geçer, kanaliküler kısımda yükselerek durayı deler ve kavernoöz segmenti oluşturmak üzere petrolingual ligamenti geçer. Karotikotimpanik ve pteryoid (vidian) olmak üzere iki dalı vardır.

Kavernoöz (C4) segmenti; sinüsü de döşeyen vasküler membran ve postgangliyonik sempatik sinirlerle sarıdır. Proksimal dural halkada sonlanır. Birçok dalı vardır. En proksimalde olan ve en büyük olan dalı meningohipofizeal trunkustur. Meningohipofizeal trunkus Bernasconi ve Cassinari arteri olarak da bilinen tentoriyal arteri, dorsal meningeal arteri ve hipofizin posterior lobunu besleyen inferior hipofizeal arteri verir. Ayrıca C4 hipofizin kapsülünü besleyen Mc. Connell'in kapsüler arterini de verir.

Klinoid (C5) segmenti; ICA'nın intradural olduğu yerde distal dural halkada sonlanır.

Oftalmik (C6) segmenti; distal dural halkadan başlar, posterior kommunikanın (p-comm) hemen proksimalinde sonlanır. Oftalmik arteri, superior hipofizeal arter dallarını, posterior kommunikan arteri, anterior koroidal arteri verir.

Kommunikan (C7) segmenti; posterior kommunikanın orijininde başlar, 2. ve 3. kraniyal sinirlerin arasında seyrederek anterior perforan substansın altında anterior serebral arter (ACA) ve middle serebral arter'e (MCA) dallandığı yerde sonlanır (17).

2.2.2. A.Cerebri Anterior (ACA):

Optik siniri üstten çarpazlayan ACA karşı tarafın ACA'sı ile a. communicans anterior aracılığı ile anastomoz yapar. Beş segmente bölünür. A1; prekommunikan veya horizontal segment olarak da bilinir. ICA bifurkasyonundan orijin alır ve a. communicans anterior'a (a-comm.) kadar uzanır. A2; postkommunikan segment olarak da bilinir. a.comm.'dan orijin alır, rostrum konturunu izleyerek korpus kallosumun genuna kadar uzanır (kallozomajinal çıkışına kadar). A3; kallozomajinal dallanma noktasından başlar ve genunun 3 cm. posteriorunda korpus kallosumun üst yüzeyine kadar devam eder. A4; perikallosal dallardır. A5; terminal dallardır. Heubner'in rekürren arteri, medial orbitofrontal arter, frontopolar arter, kallozomajinal arter (internal frontal dallar ve parasentral arteri verir), perikallosal arter (ACA'nın devamı) da dallarıdır (17).

2.2.3. A.Cerebri Media (MCA):

MCA beş segmentte incelenir. M1; horizontal segmenttir, orijin noktasından bifurkasyon noktasına kadardır. M2; bifurkasyon noktasından Sylvian fissürden çıkış noktasına kadar olan segmenttir. M3 ve M4 distal dallar ve M5 terminal dallar olarak adlandırılan segmentlerdir. Verdiği dalların en önemlileri; medial (her yanda 3-6 adet) ve lateral lentikülostriat arterler, anterior temporal arter, posterior temporal arter, lateral orbitofrontal arter, assenden frontal (candelabra) arter, presantral (prerolandik) arter, santral (rolandik) arter, anterior parietal (postrolandik) arter, posterior parietal arter ve angular arterdir (17).

2.2.4. A.Cerebri Posterior (PCA):

Baziler arter ponsun üst sınırında iki posterior serebral artere bölünür. PCA dört segmentte incelenir. P1 (pedinküler); orijin noktasından posterior kommunikan artere kadar olan segmenttir, uzun ve kısa sirkumfleks ve talamoperforan arterler bu segmentten yükselir. P2 (ambient); posterior kommunikan arterin orijin noktasından inferior temporal arterin orijinine kadar uzanan segmenttir, ambient sisterni çarpazlar ve hippokampal, anterior temporal, pedinkular perforan ve medial posterior koroidal arterler bu segmentten yükselir. P3 (kuadrigeminal); inferior temporal dalın orijin noktasından terminal dalların orijin noktasına kadar uzanan segmenttir, kuadrigeminal sisterni çarpazlar. P4; parieto-okspital ve kalkarin arterlerin orijin noktasından sonraki segmenttir ve PCA'nın kortikal dallarını içerir (17).

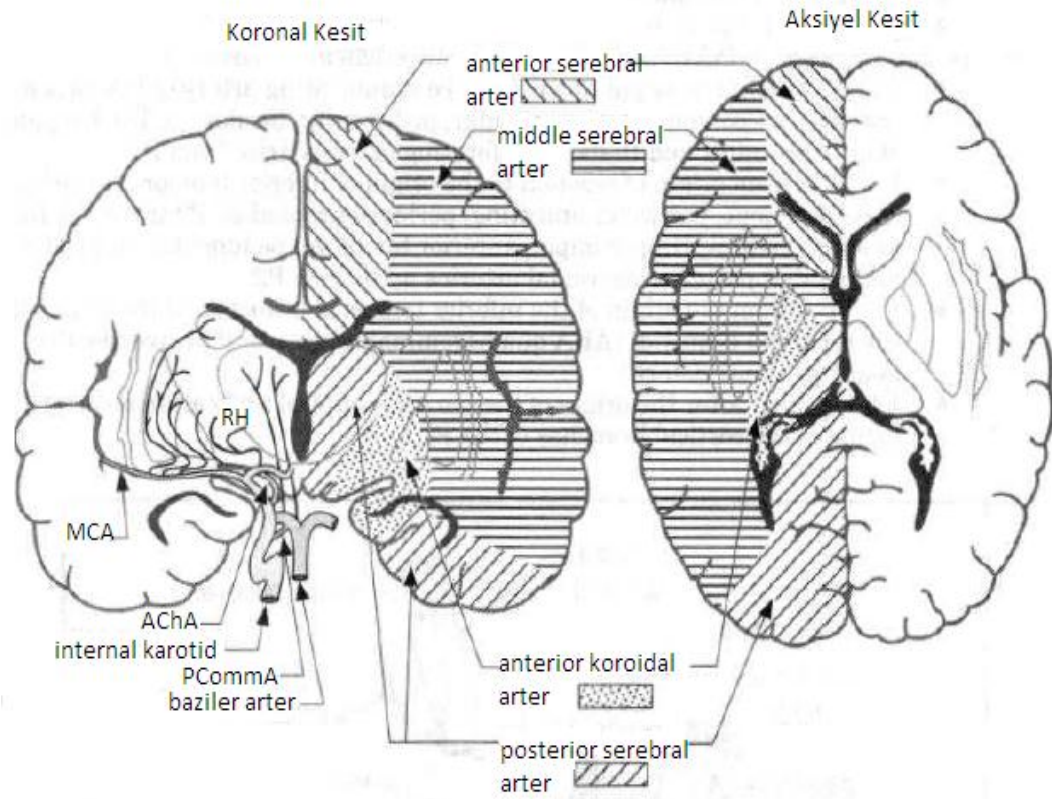
2.2.5. A.Vertebalis (VA):

Vertebral arter a. subclavia'nın ilk ve genellikle en geniş dalıdır. Sol VA % 60 oranda dominanttır ve % 4 oranında varyasyon olarak arkus aortadan yükselir. Çapı yaklaşık 3 mm. olup ortalama kan akımı 150 ml./dak. dır. Sağ vertebral arter % 10 ve sol vertebral arter de % 5 oranda hipoplastik olabilir. Sol VA'in atretik olması ve a.basilaris (BA) ile birleşmemesi % 3 oranında gözlenirken bu oran sağ VA için % 2'dir. VA; 6. Servikal vertebra hizasından başlayarak foramen transversiumlardan geçerek yükselir ve atlasın üst kenarında medialize olur. Foramen magnumdan geçerek intrakraniyal seyrine başlar ve karşı tarafın VA'sı ile birleşerek BA oluşturur. Dört segmentte incelenir. Birinci segment; süperior ve posteriorda yükselir ve genellikle 6. Vertebra korpusundan foramen transversiuma girer. İkinci segment; servikal vertebraların transvers foramenleri içinde vertikal olarak yükselir, seyri sırasında genellikle stellat gangliyondan gelen sempatik lifler ve venöz pleksuslardan oluşan bir ağ eşlik eder ve aksisin transvers prosesi hizasında laterale döner. Üçüncü segment; aksisin forameninden çıkar atlasın üst yüzeyindeki olukta posteriora ve mediale doğru yaylanır foramen magnuma girer. Dördüncü segment; durayı deler ve subaraknoid aralığa girer. Alt pontin sınırdaki vertebral konfluensde karşı tarafın VA'sı ile birleşerek BA'i oluşturur. Verdiği dallar; anterior meningeal arter (vasküler oklüzyonda kollateral olarak davranabilir), posterior meningeal arter, meduller

(bulbar) arterler, posterior spinal arter, posterior inferior serebellar arter (PICA) ve anterior spinal arterdir. PICA; VA'nın en geniş dalıdır, VA'nın intradural olduğu noktanın yaklaşık 10 mm. uzağından ve vertebrobaziler bileşkenin 15 mm. proksimalinden yükselir (% 5-8 ekstradural orijinlidir). PICA'nın segmentleri; anterior medüller, lateral medüller, tonsillomedüller, telovelotonsiller (supratonsiller) ve kortikal segmentler olmak üzere 5 tanedir. Cerrahi sırasında ilk 3 segment mutlaka korunmalıdır, diğer 2 segment sakrifiye edilirse minimal defektler gerçekleşir. PICA'nın dalları; koroidal arter (dal1) ve terminal dallardır [tonsillohemisferik (dal 2) ve inferior vermian (dal 3)] (17).

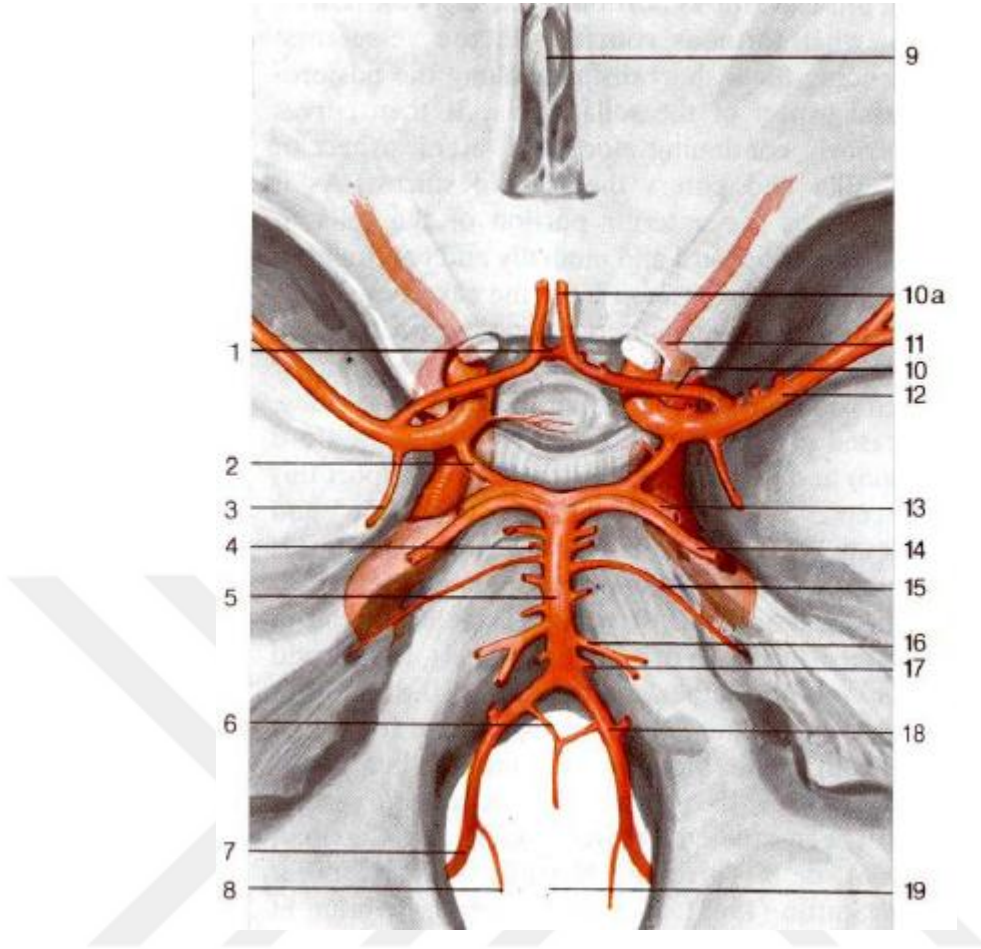
2.2.6. A.Basilaris (BA):

Vertebral arterlerin birleşmesi ile oluşur. Dalları; anterior inferior serebellar arter (AICA), a. auditorius interna (a. Labyrinthine), pontin dallar, a. serebellaris superior (SCA), posterior serebral arterdir (PCA) (17).



Şekil 8: Cerebral hemisferlerin vasküler alanlarını gösteren diyagram. RH: Heubner'in rekürren arteri, AChA: Anterior koroidal arter, MCA: Middle serebral arter, PCommA: Posterior kommunikan arter (17) .

Willis poligonu her iki VA ve ICA arasındaki anastomozlarla oluşan ve beynin kanlanmasını sağlayan önemli bir anastomozdur. Willis poligonu posterior serebral, posterior kommunikan, internal karotid, anterior serebral ve anterior kommunikan damarlardan oluşur ve interpedinküler fossada beynin tabanında yerleşim gösterir. Ponsun superior sınırından serebral hemisferler arasındaki longitudinal fissüre kadar uzanır; optik kiyazma, infundibulum, mamiller cisimcikleri çevreler. Willis poligonundan ve ana serebral arterlerden iki tip dal çıkar; bunlar kortikal ve santral dallardır. Santral arterler beyni penetre ederek bazal ganglialar gibi derin yapıları kanlandırır. Kortikal dallar ise piamaterin içinde seyrederek ve beynin daha yüzeysel dokularını kanlandırır. Anterior serebral arter medial ve superior yüzeyin çoğunu ve frontal polü kanlandırır. Middle serebral arter lateral yüzey ve temporal polü kanlandırır. Posterior serebral arter de alt yüzeyi ve oksipital polü kanlandırır. Beynin yüzeyinde serebral arterlerin birbirleriyle küçük terminal dallar aracılığı ile kurdukları önemli anastomozlar bulunmaktadır. Ana serebral arterlerin birinde oklüzyon olması halinde anastomozlar aracılığı ile diğer serebral arterlerden kan akımı kısmen devam ettirilir. Kollaterallerle sağlanan kan akımı yetersiz olmakla beraber oklude olan arterin kanlandığı alanın bir kısmı infarkttan korunmuş olur. Tipik bir Willis poligonunda anterior ve posterior kommunikan arterler aracılığı ile serebral arterler arasında bir miktar kan transferi gerçekleşir; bu nedenle bu sistem poligona giren major arterlerin birinin obstrüksiyonundaki kollateral dolaşımda önemli rol oynar. Yaşlı bireylerde poligonu oluşturan anastomozlar büyük arterlerin ani oklüzyonunda yetersiz kalabilir ve sonuçta inme (stroke) meydana gelir (18).



Şekil 9: Kafa tabanında Willis Poligonu'nun görünümü (19).

- | | |
|-------------------------------|--|
| (1)Anterior kommunikan arter | (10a) Perikallozal arter |
| (2)Posterior kommunikan arter | (11) Oftalmik arter |
| (3)Anterior koroidal arter | (12) Middle serebral arter |
| (4)Pontin ramus | (13) Posterior serebral arter |
| (5)Baziler arter | (14) Superior serebellar arter |
| (6)Anterior spinal arter | (15) Labirintin arter |
| (7)Vertebral arter | (16) Anterior inferior serebellar arter |
| (8)Posterior spinal arter | (17) Middle inferior serebellar arter |
| (9)Krista galli | (18) Posterior inferior serebellar arter |
| (10) Anterior serebral arter | (19) Foramen magnum |

2.3 Ratlarda Beyin

Beynin vasküler sistemi birçok açıdan eşsiz ve diğer organlardan daha heterojen yapıya sahiptir. Beyindeki serebral kapiller yoğunluğu 260 mm./mm³ (beyaz madde averajı) ile hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik nükleuslarında olduğu gibi 2000 mm./mm³ arasında değişir. Bu sayısal farklara ek olarak kapiller yapıda metabolik hızla ilgili olarak geniş varyasyonlar gözlenebilir (özelleşmiş endokrin sekretuar mekanizmalar varlığında olduğu gibi) . Sinir sistemindeki damarlarında yoğun endotelial sıkı-bağlantılar (tight-junction) bulunur; bu yapılar boşlukları sıkı bir şekilde doldururlar ve özelleşmiş transport sistemleri haricinde suda çözünabilir moleküllerin damar dışına kaçışını engellerler. Beynin çoğu alanında kapiller yapıların geçirgenliği yüksektir ve bu beyin dokusu ile birlikte sinir hücreleri için kan içeriği yüksek bir mikro çevre meydana getirir. Beyin sirkülasyonunun diğer bir özgül özelliği de diğer organlarda olduğu gibi lenfatik sisteme sahip olmamasıdır. Beyin dokusunda ve subaraknoid aralıkta biriken depozitlerin beyin-omurilik sıvısına (BOS), oradan da kribriiform tabaka ve kranial ve spinal sinirlerin trunkuslarının çıktığı boşluklardan ekstrakranial ekstremler sıvıya ve en sonda da lenf nodlarına ulaştığı düşünülmektedir. Ratlarda serebral arterler ve venler kompleks kapiller ağlarla birbirlerine bağlı olmakla beraber çift halinde seyretmezler. Rat serebral vasküler sisteminin diğer bir önemli karakteristiği de (birçok türde olduğu gibi) arterler ve venler arasında direkt bağlantıların (A-V şantlar) olmamasıdır. Çok sayıdaki arteriyel ve venöz anastomozların varlığı kan damarlarının oklüzyonuna bağlı beyinde komplet lokalize iskemi gerçekleşmesini imkansız hale getirir. Ratlarda arteriyel anastomozlar dallanmanın tüm seviyelerinde (büyük arteriyel sistemlerden kapillerlere kadar) gözlenebilir. Aynı gerçek venöz sistem için de geçerlidir (20).

2.4. Epidemiyoloji ve İnsidans

Beyin kan akımında azalma veya kesilme, bunun sonucunda enerji kaynaklarının tükenmesi ve buna bağlı nöronal dejenerasyon ve ölümle sonuçlanan olaylar kaskadına serebral iskemi denir (1, 2) . Beyni besleyen damarların altta yatan

patolojilere bağılı olarak total veya kısmi oklüzyonu ile ortaya çıkan klinik tabloya iskemik strok (inme) denir. Strok batı dünyasında kimi yazarlara göre üçüncü, kimi yazarlara göre de ikinci sıklıkta ölüm nedeni (ortalama %27) ve en sık morbiditeye yol açan hastalık grubudur (20-24). Batı toplumlarında strokun yaklaşık %80'i iskemik kökenlidir (21) . Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 600.000 iskemik ve 100.000 hemorajik serebrovasküler olay olgusu görülmekte ve bunların da 175.000'i ölümle sonlanmaktadır (25). Türkiye'de strokun prevalans ve insidansı ile ilgili kayıt altında sağlıklı veriler yoktur. Türkiye'de hastaların genel özellikleri ve risk faktörlerinin araştırıldığı hastane tabanlı çok merkezli bir çalışmada hemorajik strokun oranı %28, iskemik strokun oranı da %72 bulunmuştur (26). Yaşlara göre yıllık strok insidansı; 55-64 yaş aralığında 1.7-3.6/1000 kişi, 65-75 yaş aralığında 4.9-8.9/1000 kişi, 75 yaştan sonra 13.5-17.9/1000 kişi olarak bulunmuştur (27). Kadınlarda 55-64 yaş aralığında strok insidansı erkeklere göre 2-3 kat daha azdır ancak 85 yaşına doğru bu farkın azaldığı bildirilmiştir (28). Ülkeden ülkeye farklı olmakla birlikte 40-69 yaş aralığındaki erkeklerde serebrovasküler hastalıktan kaynaklanan ölüm oranı 40-250/100.000'dir; bu oranın kadınlarda ise 20-160/100.000 olduğu gözlenmiştir (29). Doğu Avrupa ülkeleri ve Japonya'da bu oranlar daha yüksek gözlenmektedir. Kuzey İskandinav ülkeleri, Hollanda, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve İsviçre'deki oranlar 100/100.000 seviyesinin altında olup diğer ülkelere göre daha düşüktür (29).

2.5 Beyin İskemi ve Reperfüzyonu

2.5.1 Serebral İskemi Tanımı

Dirnagl ve Siesjo gibi otorlere göre; serebral iskemi beyin kan akımında azalma veya kesilme gibi değişikliklere bağılı olarak enerji kaynakları ve oksijen desteğinin yetersizleşmesi ile başlayan ve nöronal dejenerasyon ve ölümle sonuçlanan bir olaylar zinciridir (1, 2). Bazı başka kaynaklarda da serebral iskemi, beyin kan akımında azalma; buna bağılı beynin bazal işlevlerini karşılayamayan kan akımı şeklinde tanımlanmaktadır (30) . Beyin; kan akımı ve regülasyonunu sağlayan birçok mekanizmaya rağmen iskemiye toleransı oldukça kısıtlıdır ve kan akımında

gerçekleşen bu değişikliklere bağlı olarak çeşitli nörolojik tablolar ortaya çıkabilir. Meydana gelen kısmi veya komplet vasküler oklüzyona bağlı olarak kan akımının belirli bir seviyenin altına düşmesi durumunda ilgili vasküler yapının kanlandığı alanda beyin parenkimi temel hayat fonksiyonlarını sürdürememeye başlar ve nekroz gerçekleşir. Olayın en alevli olduğu bu parenkim alanına “iskemik çekirdek” (core) denir. İskemik çekirdeğin çevresindeki parenkim dokusunda periferik doğru gidildikçe artan farklı kan akımı seviyelerine sahip alanlar vardır. Bu alanlar da iskemik prosesin etkisi altında olmakla beraber henüz infarkt gelişimi yoktur ancak iske mi düzeltilemez ise nekroz oluşma potansiyeli vardır. Kan akımının azaldığı ancak nekroz ve kalıcı hasarın oluşmadığı bu parenkim alanına “kurtarılab ilir doku” adı verilmektedir. Kurtarılab ilir doku iskemik beyin hasarlanmasının günümüzdeki tedavisinde temel odağı durumundadır ve tedavi modaliteleri bu alanı kurtarmaya yönelik düzenlenmektedir (27). Beyin damar hastalıkları iskemik ve hemorajik olmak üzere iki alt başlıkta incelenebilir. İskemik strok bu iki ana sınıfın yaklaşık %80’ini oluşturmaktadır. İskemik strok ilgili parankime giden kan akımındaki azalmaya bağlı oksijen, glukoz düzeylerinin azalması ve nöronal dokuda fonksiyon kaybına yol açar. Hemorajik strok ise parenkim içi veya subaraknoidal hemoraji gibi nedenlerle benzer patogenezi meydana getirir. Bu iki klinik antitenin tedavi modaliteleri farklıdır, bundan dolayı da tanılarının hızla konulması ve bu klinik tabloların birbirinden ayırt edilmeleri gerekmektedir (22, 24, 31, 32). Beyin kan akımının azalma veya kesilmesi tüm parenkimi etkileyecek bir vasküler yapıdan kaynaklanırsa bu duruma global serebral iske mi; sadece bir bölgeyi etkileyecek bir vasküler yapıdan kaynaklanırsa bu duruma da fokal serebral iske mi denmektedir. Kimi kaynaklarda serebral iske minin kan akım derecesine göre de adlandırılabilce ği ifade edilmektedir.

2.5.2 Serebrovasküler Olaylarda Kısa Tarihçe

Serebrovasküler olaylar (SVO) yıkıcı sonuçlarına rağmen çok eski çağlardan beri fark edilmiş ve değerlendirilmeye çalışılmıştır. Hippokratın yazılarında major strokla etkilenen hastaları tanımlamak amacı ile apopleksi terimi sıklıkla kullanılmıştır. Milattan önce 400’de Hippokrat major stroktan önce olan; vücudun aynı tarafında karıncalanma ve hissizlik şeklinde tanımladığı minör transient iskemik

ayağı da gözlemlemiştir. Hippokrat aynı zamanda hastaların hastalıklarının üç ile beşinci günlerinde öldüklerini; stroktan sonra bir hafta yaşayanların genellikle kurtulduklarını da kaydetmiştir (33). Donley'in raporladığına göre Wepfer 1658'de basılan kitabı "Treatise de Apoplexia" da serebral arterler ve iskemi arasındaki ilişkiyi ilk olarak ifade etmiştir (34). Clarke tarafından da ifade edildiği gibi, Hunt 1914'de karotid arter oklüzyonuna bağlı gelişen kontralateral hemiparezi ve ipsilateral monoküler körlükle giden sendromu tanımlamıştır (35). Wilks 1859'da spontan intraserebral kanama ile travmatik kanamayı birbirinden ayırt etmiştir (36). Fazio; 1834'ün başlarında Piorry'nin intraserebral hemoraji tedavinde kafatasını delmeyi (trepanasyon) önerdiğini belirtmiştir (37). MacEwan 1888'de intraserebral hematoma için ilk başarılı kranyotomiği yapmıştır (38). Cushing'in intraserebral hematoma ilgisi, intrakraniyal hipertansiyonla ilgili gözlemleriyle canlanmıştır (39). Serebral iskeminin cerrahi tedavisi karotid endarterektomiden çeşitli revaskülarizasyon işlemlerine kadar çeşitlilik gösterir. Hemorajik strokun cerrahi tedavisi ise tartışmalıdır. Cushing 1903'de intraserebral hematoma boşaltılmasını raporlamıştır (39). Bagley 1932'de derin intraserebral hematomları yüzeysel olanlardan ayırt etmiş ve cerrahi önemini tanımlamıştır (40). Penfield 1933'de intraserebral hematomların boşaltma tekniğini detaylandırmıştır (41). McKissock ve arkadaşları tarafından 1961'de yapılan ve dönüm noktası olan çalışmada intraserebral hematomlarda medikal ve cerrahi tedavi yaklaşımları karşılaştırılmıştır. McKissock ve arkadaşlarının yaptıkları randomize, prospektif klinik çalışmada cerrahi ve medikal yaklaşım yapılan gruplar arasında belirgin bir fark bulunamamıştır (40). Hamilton ve Zambramski tarafından da tartışıldığı gibi; diğer üç modern prospektif çalışmaya göre (1983'de Auer, 1989'da Juvela, 1990'da Batjer tarafından gerçekleştirilen) cerrahi tedavi lobar hematomlarda yararlı olabilmekte ancak derin yerleşimli hematomlarda cerrahi tedavi yararlı olmamaktadır (42). İntraserebral hematomların cerrahi boşaltılmasında stereotaktik aspirasyon, nöroendoskopi, gerçek zamanlı BT kılavuzlu aspirasyon denenmiştir (43). Günümüzde ve gelecekte yapılacak çok merkezli, geniş olgu içeriği olan çalışmaların da katkısı ile serebrovasküler olayların yönetimi ile ilgili optimum yöntemler ve yolların netleşmesi beklenmelidir.

2.5.3. Beyin Kan Akımı ve Serebral Perfüzyon Basıncı

Erişkin insan beyni total vücut ağırlığının yaklaşık %2'si olmasına rağmen dinlenme halindeki vücutta diğer organların bazal ihtiyaçları ne olursa olsun kalp atımı ile pompalanan kanın yaklaşık %15'ini alır. Beyin kan akımında tama yakın meydana gelebilecek kesintiler saniyelerle ölçülebilecek sürede bilinç düzeyi değişikliklerine, dakikalar içinde de geri dönüşümü olmayan patolojik süreçlere yol açar. Beyin oksijen ve glukoz açısından ihmal edilebilecek kadar düşük depo fonksiyonuna sahip olduğundan vücut tarafından devamlı desteklenmeye ihtiyaç duyar. Bu zorunluluklar nedeni ile beynin kan akımı hassas fizyolojik mekanizmalar ile organizma içi ve dışı değişkenlere karşı spektrumu geniş ama sınırları belirgin şekilde kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır (21, 44, 45). Beyin kalp atım volümünün %15-20'sine ek olarak vücudun total oksijen miktarının da %25'ini tüketir (45). Bu miktarın %60'ı nöronal elektriksel aktivite üretimi için ATP sentezlemek amacı ile kullanılır. Serebral metabolizma hızı (CMR) oksijen tüketimi olarak ifade edilir (CMRO₂). CMRO₂ değeri erişkin insanda 3-3.5/ml/100g/dak.dır. Beyin O₂ tüketimi bu kadar yüksek olmasına rağmen oksijen rezervi bulunmadığından beyin parenkim perfüzyonunun durması ile yaklaşık on saniyede bilinç kaybı gerçekleşir ve parsiyel oksijen basıncı 30 mm.Hg.nın altına iner. Kan akımı üç ile sekiz dakika arasında yeniden sağlanamaz ve parenkim iskemik kalmaya devam ederse mevcut adenosin trifosfat (ATP) depoları tükenir ve irreversibl beyin parenkim hasarı başlar. Hipoksiye en duyarlı beyin bölgeleri hipokampus ve serebellumdur (21).

Beynin metabolik ihtiyacının karşılanmasındaki hassas dengeler serebral kan akımı üzerine kuruludur ve en önemli parametre serebral kan akımıdır. Serebral kan akımı (SKA) serebral perfüzyon basıncının (SPB) serebral vasküler rezistansa (SVR) oranıyla belirlenir (27).

$$SKA = SPB / SVR$$

SPB beynin arteriyel ve venöz uçları arasındaki basınçtır ve venöz basınç farkı ile intrakraniyal basınç (IKB) pratikte benzer olduğundan SPB sıklıkla sistemik ortalama arter basıncıyla (SOAB) IKB arasındaki fark şeklinde tanımlanır (46).

$$SPB = SOAB - SVB \text{ veya } SPB = SOAB - IKB$$

SPB ortalama 80 – 100 mm. Hg. arasında seyrederek. Bu basınç farkı sistemik dolaşımda bulunan metabolitlerin ve moleküllerin beyin dokusunda geçişini sağlar. Normal koşullarda SPB sabit olmakla beraber; sistemik arter kan basıncı ve serebral venöz dönüşü etkileyen durumlarda perfüzyon basıncı etkilenir. Sistemik arter kan basıncı eşik değerin altına düştüğünde, IKB arttığında beyin perfüzyon basıncı global olarak azalır. SPB normal olduğunda serebral kan akımı değişiklikleri serebral vasküler rezistanstaki değişikliklerden kaynaklanır. Serebral arterlerin yarıçaplarının değişmesi serebral vasküler rezistansı belirler ve serebral kan akımı değişikliklerine neden olur. Arter yarıçaplarının değişmesi birçok parametreye bağlıdır. Potasyum ve hidrojen iyonları damar lümeni üzerinden etki göstererek kimyasal vazodilatasyon yaparlar. Parsiyel arteriyel karbondioksit basınç değişiklikleri serebral vazomotor etki gösterir. Parsiyel arteriyel karbondioksit basınç artışı vazodilatasyona, azalması ise vazokonstrüksiyona neden olur. Arteriyel oksijen içeriği de bu döngü içindeki bir diğer önemli serebral vasküler rezistans düzenleyicisidir. Parsiyel oksijen basıncındaki değişiklikler, hematokritteki değişiklikler oksijen düzeyini sabit tutacak şekilde serebral vasküler rezistansta kompensatuvar değişikliklere neden olurlar. Serebral perfüzyon basıncı 50 mm.Hg.'nin altına indiğinde EEG dalgalarında yavaşlama gözlenir. Serebral perfüzyon basıncı 25 – 40 mm.Hg. olduğunda EEG'nin düz çizgi çizdiği gözlenir. Serebral perfüzyon basıncı 25 mm.Hg.'nin altında seyrettiğinde ise geri dönüşümsüz beyin hasarı gerçekleşir (21, 27). Lassen'in yazılarında belirttiği üzere nöronal metabolizma laktik asit üretimiyle yakından ilişkilidir ve laktik asit birikimine bağlı olarak ekstrasellüler pH'da azalma ve vasküler dilatasyon gerçekleşir (47).

Normal serebral kan akımı, ortalama arter basıncı 60 – 130 mm.Hg. olan bir insanda 45 – 60 ml./dk./100 gr.'dır (48). Serebral kan akımının 20 – 25 ml./dk./100 gr. olması durumunda hafif anestezi altındaki normotermik bir bireyde EEG dalga aktivitelerinde değişiklik görülmemesine rağmen beyin metabolizmasındaki su, elektrolit dengesinde anlamlı değişiklikler görülmeye başlanır (49). Serebral kan akımının bu seviyenin de altına düşmesi halinde EEG aktivitesi kaybolmaya başlar. Serebral kan akımı 15 ml./dk./100 gr.'ın altına inerse kortikal elektiriksel yanıt

kaybolur. Serebral kan akımının 10 – 12 ml./dk./100 gr. olması halinde iyon hemostazı kaybolur, ani ve tam nöronal depolarizasyon gözlenir. Bu durumda nöron yapısından ekstraselüler aralığa masif potasyum (K) iyonu geçişi ve intraselüler alana sodyum(Na) ve kalsiyum (Ca) geçişi olur. Bu kaskadın bir sonraki basamağı da hücre içinde su tutulumu ve hücrenin şişmesidir.

Sistemik arteriyel perfüzyon basıncında olan değişikliklere rağmen serebral kan akımını sabit tutmaya yarayan fizyolojik bir otoregülasyon mekanizması vardır. Serebral perfüzyon basıncı düştüğünde otoregülasyonla; serebral damarlarda vazodilatasyon, serebral perfüzyon basıncı yükseldiğinde de serebral damarlarda vazokonstriksiyon meydana getirilerek kan akımı sabit tutulmaya çalışılır (46).

Ortalama arter basıncı 50 – 150 mm.Hg. arasında seyrettiğinde, otoregülasyon sayesinde serebral kan akımı önemli değişikliklere uğramaz. Bu değerlerin altına inilmesi veya üstüne çıkılması halinde ise serebral kan akımı basınç bağımlı bir hale gelir ve serebral perfüzyon basıncı ile lineer doğrultuda değişir (50).

Birçok etyolojik nedenle mevcut olan bu otoregülasyon bozulabilir. Bu nedenlerin en sık gözlenenleri; kafa travması, subaraknoid kanama (SAK), serebral hipoksi ve iskemidir. Kafa travmalarında, beyin kanamalarında IKB artışı ve buna bağlı olarak serebral perfüzyon basıncı düşerse serebral kan akımını arttırmak için kan basıncında refleks olarak gözlenen yükselmeye ‘‘ Cushing Refleksi ‘‘ denir (51).

Serebral otoregülasyonu açıklamak amacı ile miyojenik, nörojenik, metabolik mekanizmalar ileri sürülmüş olsa da kesin kontrolü sağlayan mekanizma bilinmemektedir (21). SPB'daki düşmeye arteriyel yapıların genel yanıtı vazodilatasyon yönündedir. SPB'daki yükselmeye arteriyel yapıların genel yanıtı ise vazokonstriksiyon yönündedir. Bu etkileşim Bayliss tarafından 1902'de tanımlanmış olup kendi adıyla ‘‘Bayliss Etkisi’’ ya da ‘‘miyojenik varsayım’’ adı ile anılmaktadır. Miyojenik varsayıma göre translüminal basınç artışına bağlı damar duvarlarındaki düz kaslarda gerilme meydana gelir, radial liflerin refleks olarak gerilimi de etkisini damar çapında daralma yani vazokonstriksiyon şeklinde gösterir. Translüminal basınçta azalma ise bu varsayıma göre tam ters etki doğurur ve vazodilatasyona yol açar (21, 52, 53). Bayliss etkisi ilk 30 saniyede kompensatuvar

değişiklikleri oluşturur; ardından yavaş seyirli olarak metabolik faktörler ve diğer bir dizi etken kan dolaşımının düzenlenmesinde görev alır. İlk birkaç dakikada Bayliss etkisi daha önemli ve dominant iken ilerleyen saat ve günlerde rolü azalır (21).

Metabolik varsayıma göre serebral kan akımının azalması ile beyinden vazoaaktif substanslar serbestleştirilir ve serebral rezistan arterlerin dilatasyonu uyarılır. Buna neden olduğu düşünülen faktörler; karbondioksit, hidrojen, potasyum, kalsiyum ve adenoindir (21, 54, 55). Serebral kan akımı otoregülasyonunda endotelial faktörlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Bazı yayınlarda endoteliumun mekanoreseptör rolü oynayabileceği de vurgulanmaktadır (21, 56, 57).

Nörojenik varsayım üzerinde en çok araştırma yapılan konulardandır. Geniş çaplı serebral damarların pial dallarına sinir liflerinin eşlik etmekte olduğu gösterilmiştir (58-60). Bu konu ile ilgili ortak görüş ise bu liflere damar çeperlerinde rastlanabileceği ve parasempatik liflerin sempatik liflere oranla küçük çaplı damarlarda daha az görüldüğü yönündedir (59, 61, 62). Meyer ve arkadaşlarının çalışmalarında parankim içindeki küçük çaplı vasküler yapıların duvarlarında beyin sapı kökenli parasempatik liflerin varlığı belirtilmiştir (63, 64). Serebral dolaşımın nörojenik uyarılara verdiği yanıt vücudun diğer organlarındaki kan damarlarında görülenden daha azdır (21, 59). Serebral damarların adrenerjik ve kolinerjik ajanlardan etkilenebileceği gibi, bu ajanlarla etkilenmiş damarlardaki ilgili ajanların etkileri bloke etme özelliği olan başka ajanlarla inhibe edilebilir (58-61, 63). Sempatik, parasempatik lifler veya beyin sapı yapılarının uyarılması sonucu yüzeyel kortikal arteriyel yapılar vazokonstriksiyona uğrar ve bu serebral kan akımının azalmasıyla sonuçlanır (59, 60, 64). Sempatik veya parasempatik uyarının sonlanması veya blokajı PaCO₂ ve perfüzyon basıncı değişikliklerine karşı serebral vasküler yapıların regülatuar yanıtlarını değiştirebilir (65). Genel olarak pial vasküler yapıların parenkimal vasküler yapılara göre daha büyük ölçüde innerve edildikleri; serebral vaskülaritenin de yaklaşık %40'ının bu yapılardan kaynaklanması nedeni ile otoregülasyonun parenkim dışı alanda nörojenik etkilerle daha belirgin, parenkim içi alanda da metabolik etkilerle daha belirgin düzenlendiği düşünülmektedir (59, 60). Serebrovasküler yapılardaki düz kaslar ve kan beyin bariyeri endoteli üzerinde yapılan çalışmalarda vazoaaktif ajanlar ve bunların fonksiyonel özellikleri

gösterilmeye başlanmıştır. Bu vazoaaktif ajanlar lokal serebral kan akımı, metabolizma, nöronal aktivite arasındaki fizyolojik etkileşimleri düzenlemektedirler. Serebral kan akımı ve matabolik gereksinimlerle ilgili homeostatik mekanizmalar aralarında serebral metabolizma için önemli rolü olan moleküller (hidrojen, oksijen, karbondioksit, pH), vazoaaktif gazlar, lipidler, fosfolipidler, aminler ve vazoaaktif peptidler gibi birçok parametre ile ilgilidir (21, 45). Serebral vasküler yapılarda etki eden vazoaaktif maddeler; aminler, lipidler, peptidler, purin grubu nükleotidler, nitrik oksit (NO) ve karbondioksitten oluşmaktadır. Aminler arasında norepinefrin, serotonin, histamin, dopamin, asetil kolin, 5-hidroksitriptamin sayılabilir. Lipidler arasında eikozanoidler, prostasiklin, tromboksan A₂, prostoglandinler, sistenillökotrien, platelet aktive edici faktör sayılabilir. Peptidler vazodilatatör ve vazokonstrüktör olanlar şeklide iki ana grupta değerlendirilebilir. Vazodilatatör peptidler arasında vazoaaktif intestinal peptid, histidin, izolösün, pitüiter adenilat siklaz aktive edici peptid, kalsitonin gen bağımlı peptid, adrenomedullin, substans P, bradikinin sayılabilir. Vazokonstrüktör peptidler arasında nöropeptid Y, anjiyotensin II, endotelin I, vazopressin sayılabilir. Purin grubu nükleotidler arasında galanin, somatostatin, dinorfin B, nörotensin, adenoazin, adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP) sayılabilir (45, 66).

Serebral dolaşımdaki vasküler kas yapısının gevşemesinde geçerli olduğu düşünülen üç ana mekanizma vardır. Birinci mekanizma “siklik 3-5-guanezin monofosfat” (cGMP) üretiminin artışı ve guanilat siklaz aktivasyonudur. İkinci mekanizma “siklik 3-5-adenozin monofosfat” (cAMP) üretimi ve adenilat siklaz aktivasyonudur. cGMP ve cAMP ‘nin intraselüler artışı çeşitli mekanizmalar sonucunda intraselüler kalsiyumu azaltır ve bunun sonucunda da vasküler kaslarda gevşeme olur. Üçüncü mekanizma ise potasyum kanalları aktivasyonu ile ilgilidir. Potasyum kanalları aktive olunca potasyum atılımı artar bunun sonucunda da vasküler kas hiperpolarize olur. Membran hiperpolarizasyonu nedeniyle voltaj bağımlı kalsiyum kanalları kapanır, bunun sonucunda da vasküler kaslarda gevşeme gerçekleşir (21, 45).

Karbondioksit serebral kan akımı üzerinde önemli bir role sahiptir. Hiperkapni sonucu serebral vasküler yanıtta vazodilatasyon, hipokapni sonucu ise

vazokonstriksiyon gerçekleşir. Hiperkapni daha çok küçük çaplı serebral arteriollerde dilatasyon gerçekleştirmesine rağmen hipokapninin vazokonstrüktör etkisi damar çap farkı ile ilintili değildir. Uzun süren hiperkapni veya hipokapni nedeni ile akut dönemde serebral kan akımında görülen değişiklikler sonraları değişir. Karbondioksitin serebrovasküler etkileri ile ilgili olarak nöral ekstremlüler sıvının hidrojen iyon konsantrasyonu, prostaglandinler, nitrik oksit ve nöral yollar ileri sürülmektedir. Bu mekanizmalardan en önemli olan ekstremlüler sıvıdaki hidrojen iyonuna bağlıdır ve diğer mekanizmalarla bağlantılıdır (54, 67, 68).

Oksijenin azlığına bağlı gerçekleşen hipoksi serebral kan akımını artırır. Oksijene bağlı regülasyonda karbondioksit ile ilgili regülasyondan farklı olarak normale yakın alandaki küçük değişikliklere bağlı olarak serebral kan akımı değişmez. Hipoksiye bağlı gerçekleşen akut serebrovasküler vazodilatasyonda vasküler ve nörojenik mekanizmalar geçerlidir. Hipoksiye bağlı olarak büyük serebral damarların endotelleri aracılığı ile vazodilatatör bir ajan olan NO salınımı uyarılır, hipoksinin sürmesi halinde vazodilatasyonu destekleyen potent vazodilatatör adenosin salınımı stimüle olur (69). Serebral dokudaki oksijen duyarlı rostral ventrolateral medullar nöronların uyarılması sonucu ise nörojenik mekanizma aktive olur. Rostral ventrolateral medullanın iki yanlı lezyonu olması durumunda hipoksiye karşı gelişmesi beklenen serebrovasküler yanıt %50 oranında azalır (70).

Karbondioksit inhalasyonu sonucunda serebral ekstraselüler sıvı asidifikasyona uğrar ve bunun sonucunda da serebral kan akımının global olarak artışı gözlenir.

Hidrojen iyonları serebral kan akımını protonların vazodilatatör özelliklerine, metabolik laktat ve karbondioksitin hidrojen için kaynak olmasına bağlı olarak etkiler (55).

Potasyum iyonları serebral kan akımını serebral vasküler düz kas yapısı üzerindeki kasılmayı engelleyici özelliğine, fizyolojik süreçte nöronal aktivasyon sırasında, epileptik nöbetlerde, hipoksi ve iskemi durumlarında nöronlardan potasyumun serbest kalış özelliğine bağlı olarak etkiler. Bu sistemin detaylı kaskadı

incelendiğinde NO potasyumun vazodilatator aksiyonunda modüle edici bir göreve sahiptir (71, 72).

Nitrik oksit güçlü bir vazodilatator olup endotel kökenlidir. Nitrik oksit ile ilintili sistemde asetik kolin ve substans P gibi diğer vazodilatator ajanların nitrik oksit sentaz (NOS) uyarımını sağladığı, NO serbest kalışı olduğu ve vasküler kaslarda gevşeme ile sonlanan sürecin gerçekleştiği gözlenir. NOS inhibitörleri serebral arterlerde vazokonstriksiyon ve bölgesel kan akımında azalma ile sonuçlanan etkiler doğurur. Serebellum ve hipotalamus nöral dokuda yüksek NOS aktivitesine sahip bölgelerdir. Literatürdeki bilgiler ışığında nöronal ve endotelial nitrik oksidin vasküler tonusu ciddi oranda regüle ettiği düşünülmektedir (21).

Adenozin pürin nükleozididir ve serebral dokuda iki ana fizyolojik etkisi vardır. Birincisi sinaptik ve nöronal aktivitenin düzenlenmesidir. İkincisi ise serebral kan akımının regülasyonudur. Adenozinin topikal uygulanması sonucunda serebral arteriollerin potent dilatatorü olduğu gözlenmiştir ve uygun uyarılar sonucunda interstisyel ve serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonunun yükseldiği bilinmektedir. Fizyolojik şartlarda serebral kan akımı regülasyonunda rol oynayan adenozinin patofizyolojik durumlarda nöroprotektis etkileri olabileceği de düşünülmektedir (21).

Nöropeptidlerden olan endotelinler ET-1 ve ETa reseptörleri aracılığı ile serebral arter ve arteriyollerin potent vazokonstriktör etki gösterirler (73). Fizyolojik şartlarda endotelin reseptör antagonistleri serebral damar yarıçapları üzerinde minimal etkilidir (74, 75).

Serebral vasküler tonus üzerinde etkili olan arasıdonik asit türevleri nöron, mikrogliya, astroglia, endotel, perivasküler sinirler, düz kas ve platelet kökenlidir. Serebral vasküler düz kaslar üzerine etkili olan eikozanoidler sentez edildikleri hücrelerden beyin omurilik sıvısına salınırlar. Araşıdonik asit pial arteriollere direkt uygulanırsa etkisi dilatasyon şeklinde gözlenir ve bu etki siklooksijenaz inhibitörleri ile bloke edilebilir. Siklooksijenaz türevleri potent vazoaktifirler. Prostaglandin ve prostaglandin E2 vazodilatator, tromboksan A2 ve prostaglandin F2a vazokonstriktör etki gösterirler. Siklooksijenaz enziminin farmakolojik inhibisyonu ile bazal kan akımı azaltılabilir (76-78). Lipooksijenaz türevleri de siklooksijenaz

türevleri gibi vazoaktifirler. Lipooksijenaz türevlerinden lökotrienler, 15-hidroksieikozatetranoik asit (HETE) serebral arterlerde potent vazokonstrüktör etki gösterirler. Bu gruplardan lipoksinler ise vazodilatatör etki gösterirler (21).

Serotonin türevlerinden olan 5-hidroksitriptamin'e (5-HT) serebral arterlerin yanıtı potent vazokonstrüksiyondur. 5-HT kan beyin bariyerini geçemez, bu neden serebral dolaşımdaki sistemik etkisi düşük ölçüdedir. Kan beyin bariyerinin ortadan kalktığı durumlarda 5-HT etkisi ile serebral kan akımı ve glukoz kullanımı azalır (21,79).

Ön beyin bazalinde yerleşimli kolinerjik nöronların lokal kortikal serebral kan akımı regülasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir. Literatürdeki bilgilere göre perivasküler yerleşimli astrositler asetil kolin ve diğer vazoaktif moleküller aracılığı ile serebral doku mikrovasküler fonksiyonlarının nörojenik kontrolünde rol oynamaktadır (45).

Serebral kan akımı açısından incelendiğinde dopaminerjik sistem santral kökenli ve daha sınırlı fonksiyonu olan bir sistemdir. Noradrenalin ve adrenalin ise periferik sempatik ve santral kökenlidir ve daha geniş bir otonomik etki alanı vardır. Dopamin noradrenalinin prekursor olarak sempatik sinirlerde ve bazı türlerde de perivasküler mast hücrelerinde bulunur, beyin omurilik sıvısında düşük düzeyde bulunur. İn vitro pial serebral arterlerde dopamin potent kontraksiyon etkisine sahiptir. Dopaminerjik agonistlerin etkileri serebral kan akımında ve serebral oksidatif metabolizmada artış yönündedir. Adrenerjik ajanların etkilerinin in vivo ve in vitro çalışmalarda dual olduğu ve konstrüksiyon ve dilatasyon yönünde olduğu gösterilmiştir. Dopamine oranla intravenöz uygulanan noradrenalin serebral kan akımında minimal değişiklikler yapar. Katekolaminlerin serebrovasküler etkileri retiküler sistemdeki mekanizmalar ile ilişkili görülmektedir (21).

Sempatik sinir sistemine bağlı adrenerjik lifler arteriyel ve venöz yapılarda geniş oranda bulunurlar. Serebral vasküler yapılardaki perivasküler sinir liflerinin yaklaşık yarısı adrenerjiktir. Noradrenalin de nöropeptid-Y akut hipertansiyonda vazokonstrüksiyon için aktif aracı göreve sahiptir. Fizyolojik şartlardaki kan basıncı

azalması genellikle düşük sempatik tonusa bağlıdır. Hemorajik hipotansiyonda sempatik tonus yüksektir (21).

Serebral vaskülarite ve kan dolaşımı üzerine etki eden en güçlü nöral vazodilatatör faktör parasempatik innervasyondur. Parasempatik sistemde rol alan nörotransmitterler asetil kolin (Ach), glutamat, vazoaaktif intestinal peptid (VIP), peptid histidin izolösin (PHI) (insanda methionin), NO, helospektin I ve II, helodermindir. Parasempatik sistem metabolik regülatör faktörlerin yetersiz kaldığı durumlarda serebral kan akımını artırır (21, 80, 81).

Beyin kan akımının düzenlenmesinde trigeminovasküler sistem de rol oynamaktadır. Bu sistemi trigeminal gangliona bulunan nöronlar oluşturur ve görevleri vasküler innervasyondur. Bu sistemde rol oynayan başlıca nörotransmitterler substans-P, kalsitonin gen bağlantılı peptid (CGRP), nörokinin A (NKA), kolesistokinindir (CCK). Substans-P etkisi endotel bağlantılı olan ve pek çok vasküler kompartmanda vazodilatatör etkisi olan bir nörotransmitterdir. Nörokinin A'da serebral vasküler yapılarda dilatasyon etkisine sahiptir ancak etkisi substans-P'nin 1/10'u kadardır. Kalsitonin gen bağlantılı peptid etkisi endotel bağlantılı olan ve serebral dolaşımdaki en güçlü potent vazodilatatör nörotransmitterdir. Trigeminoasküler sistem serebral kan akımının tehlikede olduğu durumlarda daha etkindir, subaraknoid kanama gibi patolojilerde aktive olması da bu düşüncüyü destekler niteliktedir (82-84).

Serebral kapiller yapılar boyunca eritrosit akımı intravasküler ve ektravasküler birçok faktörün etkisi altındadır. Bu faktörlerin en önemlisi prekapiller arteriyol ve postkapiller venül arasındaki intravasküler akım eğrisidir. Bu basınç eğrisi sistemik arteriyel basınçtan etkilenir. Rezistan arter ve arteriollerin dilatasyonu mikrovasküler basınç eğrisini ve kapiller akım hızını artırır. Dinlenme halindeki beyin dokusunda kan hacminin yarıya yakını kapillerlerde, diğer yarıya yakını da küçük ven ve venüllerde, geri kalan yaklaşık yüzde beş oranındaki kısım da arter ve arteriollerde bulunur (21).

Kapiller yataktaki eritrosit akımında lökosit akımının da düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir. Kapillerler içinde eritrositlerin hızları 1mm./sn. civarında

olup 0.3-3.2 mm./sn. arasında değişebilir. Dinlenme halinde mikrovasküler ağ içindeki akım hızı heterojendir. Her kapillerin içindeki eritrosit perfüzyon ortalama oranı ve akım yönü sabittir. Arterioller kapillerlerdeki hız aynı boyutlardaki venöz kapillerlerinkinden 2-6 kat fazladır. Fizyolojik şartlarda kapiller yapılar plazma ve eritrositlerce perfüze edilir. Eritrosit ve plazma açısından kapiller yataktan geçiş zamanı farklıdır. Fahraeus etkisi de denen fenomene göre eritrositler aksiyel akımda plazmaya göre daha hızlı seyrederler. Bu etkiye göre eritrositler hızlı akım yollarını takip ederler ve yavaş akım yollarını plazmaya bırakırlar (85).

Serebral gri maddedeki kapiller yoğunluğu beyaz maddenin yaklaşık üç katıdır. Beynin tüm bölgelerindeki kapiller hematokrit %20-35 arasında izlenir. Neokorteksteki en yüksek kapiller yoğunluk ise lamina IV'de olup daha sonra lamina I'de izlenir (86, 87). Orta derece hipoksi serebral kan akımı ve kapiller akım hızını artırır. İnspirasyonla alınan oksijenin %15 oranında düşmesi bile kapillerlerdeki eritrosit hızı yaklaşık %40 oranında artar. Hiperkapniye yanıt da kapiller hızda artma şeklindedir. İnspirasyonla alınan CO₂ nin %5 oranında artması eritrosit hızında %31 artış ile kendisini gösterir (21).

Hemodilasyon serebral kan akımını artırır. Bu sonucu kan viskozitesine doğrudan etkisi ile ya da oksijen saturasyonunun arteriyel düzeyde düşmesine sekonder vazodilatasyon ile doğurduğu düşünülmektedir. Hematokritin %30'un altında olması durumunda hesaplanan O₂ dağılımı devamlılık göstermemektedir. Mikrovasküler yataktaki kontraksiyon özelliğine sahip hücreler kapiller kan akımını fizyolojik olarak regüle ederler. İskemi olması durumunda kapillerlerde tıkanma endotel şişmesi, trombosit agregasyonu, perivasküler astrosit şişmesi ve ödem gibi nedenlerle kapillerlere etki eden kompresyonun etkisi ile daha da artar (21).

Serebral perfüzyon basıncında azalma sonucu infarkt gelişimi olursa; bu infarktın en sık görüldüğü bölge büyük serebral damarların beslediği bölgeler arasındaki geçiş bölgeleridir. Bu şekilde olan infarkta da "hemodinamik infarkt" adı verilir. Bu şekildeki infarktlar derin sistemik hipotansiyon, Willis poligonunun konjenital anomalileriyle kollateral akım sınırlandığında internal karotid arterin tıkanmasının ardından meydana gelebilir

2.5.4.Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İnsan beyni total vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmakta olmasına rağmen dinlenme halinde inspire edilen oksijenin %20'sine, kardiyak output hacminin %15'ine, açlık anındaki karaciğer glukoz salınımının tamamına gereksinimi vardır. Serebral kortekste gri madde 6ml./100gr./dak., beyaz madde ise 2ml./100gr./dak. olacak şekilde oksijen tüketir. Beyin dokusunun glukoz kullanımı yaklaşık 4.5-7mg./100gr.civarındadır. Dinlenme halindeki serebral dokunun kan akımı 50ml./100gr.beyin dokusu/dak. civarındadır(2). Bu kadar yoğun ve hayati ihtiyaçları sağlayabilmek için beyin dokusunda yüksek bir perfüzyona ihtiyaç vardır. Beyin parenkiminin anaerobik metabolizma ve glikojen depoları çok kısa süre yetebilecek düzeydedir; bu nedenle iskekiye karşı çok duyarlıdır (88, 89).

İskekiye etyolojisi ile ilgili olarak fokal veya global iskekiye şeklinde gözlenir. Fokal iskekiye genellikle orta serebral arterin embolik oklüzyonu ile ortaya çıkmasına rağmen subaraknoid kanama, kafa travması gibi nedenlere bağlı olarak da gelişebilir. Global iskekiinin gelişimi ise kardiyak arrest sonucu gerçekleşir (4). Global serebral iskemide serebral kan akımı mevcut olmamasına rağmen fokal serebral iskemide kollateral dolanımlar sayesinde düşük düzeylerde rezidüel kan akımı potansiyeli mevcuttur. Fokal serebral iskemideki rezidüel perfüzyon hücre membran devamlılığını sağlar ve bu sayede düşük düzeyde metabolik aktivitenin devam ettirilebilmesine yardımcı olur (5). Fokal serebral iskemideki lezyon santral fokus ve perifokal alan adlı iki bölümden oluşur. Santral fokus reperfüzyonun hızla yapılmadığı durumda oluşan infarkt alanıdır; dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasarın olduğu, lezyonun en yoğun olduğu bölgedir. Perifokal alan ise elektiriksel aktivitesi sessiz, iyon pompaları halen intakt olan bölgedir. Reperfüzyon sağlanması, nöroprotektif ajanlarla desteklenmesi durumunda kurtarılabilmek olasıılığı olan alan perifokal alandır (6) .

İskemik hasarda en önemli faktör uygun miktarda enerji kaynağının olmamasıdır. Fizyolojik koşullarda beyin dokusunun enerji gereksinimi aerobik glikoliz ve bunun ürünü olan ATP ile sağlanır. Oksijen yokluğunda mitokondrilerdeki elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon bozulur, ATP sentezi

durur. ATP sentezinin durmasına bağılı olarak da asidoz, makromolekül sentezinde kesinti, iyon dengesizliğı, ATP yıkım ürünlerinin birikimi ortaya çıkar.

İskemik hasar ilk başladığında oksijen eksikliğı nedeni ile anaerobik glikoliz kısa bir süre gerçekleşir. İskemiden 2-3 dakika sonra beyin dokusundaki laktat düzeyi maksimuma çıkar. Doku laktat düzeyinin 16-20 mikromol/gr. ve üzerinde olması nörol hasara yol açar (90-92). Anaerobik metabolizma ile meydana gelen laktik asit ve hidrojen birikimine bağılı olarak hücre içi ve dışı ortamlarda asidoz gelişir (2). Laktik asit ve düşük pH'a bağılı olarak proteinlerde denatürasyon, enzimatik moleküllerde fonksiyonel kayıp, ödem, serbest radikal oluşumu gerçekleşir (93).

Hücre membranında yer alan aktif ve pasif transport sistemleri ile fizyolojik şartlarda nöronların iyon dengesi potasyumun büyük intraselüler gradienti ve ekstraselüler sodyum, kalsiyum, klor gradientleri ile sağlanır. Bu iyon dengesini sağlayan pompalar ATP gibi enerji metabolitlerine ihtiyaç duyarlar. ATP'nin olmaması durumunda iyon pompaları fonksiyon göremez; bunun sonucunda da konsantrasyon farkında bağılı K hücre dışına akarken Na, Ca, Cl absorbe olur. İyonlar arasında meydana gelen bu döngü sonucunda hücre membran depolarizasyonu meydana gelir. Na ve Cl iyonları ile birlikte hücre içine su moleküllerinin de girmesi sonucu "sitotoksik ödem" oluşur (1, 94, 95). İskemi sonrasında birikimi gözlenen metabolitlere bağılı gelişen vasküler permeabilite bozukluğu nedeni ile protein, Na, su akümülayonu oluşur ve "vazojenik ödem" denen bu süreç beyin ödeminin ikinci dönemidir ve 12-48 saat sonra maksimuma ulaşır (1, 96).

İskemik hasarın gelişiminde; hücre dışından kalsiyum girişı, hücre içi kalsiyum depolarından salınım, hücre içi kalsiyum düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulması en önemli faktörlerdir. ATP azalmasına bağılı olarak Na/K ATPaz, 3Na/Ca ve Na/H transport pompaları bozulur. Hücre içinde artan Na konsantrasyonu nedeniyle N tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanalları açılır ve hücre içine kalsiyum girer. Presinaptik uca giren kalsiyum glutamat başta olmak üzere uyarıcı aminoasitlerin sinaptik aralığa salınmasına neden olur (2, 97). Uyarıcı aminoasitlerin geri alınımı sodyum düzeyi ve membran potansiyeli ile çalışan 2Na/glutamat kotrasporterları ile olur (2, 98). Fizyolojik koşullarda hücre içindeki

kalsiyum, kalmodulin veya kalsibindin gibi bağlayıcı proteinlere bağlanarak tamponlanır. Hücre içi kalsiyumun tamponlanmasının bir diğer yolu da enerji kullanımı ile hücre içi organeller tarafından yapılmasıdır. İskeminin doğal seyri sırasında meydana gelen enerji eksikliği sonucu bu tamponlama sistemi bozulur (2).

Hücre içi kalsiyum düzeyinin erken dönemde artması ile degradasyonla sorumlu enzim grupları aktive olur; lipoliz, proteoliz, DNA hasarı başlar (93). Kalsiyum düzeyinin yüksekliği nedeni ile aktive olan fosfolipaz enzimi ile hücre ve organel membranlarındaki fosfolipidler parçalanır, buna bağlı ortamda serbest yağ asidi artışı gözlenir. Membranlardaki protein ile lipid oranının bozulması sonucu iskemik hücreye daha fazla kalsiyum girişi olur. Lipoliz ile artan serbest yağ asitleri hem iskemi, hem de reperfüzyon evresinde serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (10, 99-101). Hücre içi kalsiyum artışına bağlı ksantin oksidaz, nötral ve lizozomal proteaz aktivasyonu gerçekleşir. Bu enzim aktivasyonları ise nörofilamanlar ve hücre iskeletini oluşturan protein yapıtaşlarının yıkımına, sonuçta da dönüşümsüz hücre hasarına neden olmaktadır (10, 99, 102).

İskemi-reperfüzyonda meydana gelen doku hasarında reperfüze olan dokularda birikime uğrayan nötrofillerin aktif rol oynadığını gösteren kanıtlar vardır. Literatürde nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlatılmasında serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksitlerinin rol oynadığına işaret eden bilgiler mevcuttur (103).

Serbest oksijen radikalleri moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Başlıcaları süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksi radikalidir. Süperoksit radikali stabil değildir, hızla zayıf etkili oksidan olan hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür. Hidrojen peroksiti indirgeyen enzim olan katalazın reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde doku hasarını başlatan radikalin hidroksi radikali olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Serbest oksijen radikalleri mitokondri membranında bağlıdır ve minimal artışları bile hücre için ileri derecede toksiktir. Reperfüzyonda artan oksijen radikalleri hücre içinde deoksiribonükleik asit (DNA), proteinler ve poliansatüre yağ asitleriyle reaksiyona girer ve sonuçta da hücre zarında lipid peroksidasyonu meydana gelir (103).

En kısa ömürlü ve en reaktif oksijen radikali olan hidroksi radikalinin poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girmesi lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonunda karbon bağları kopar ve aldehid yapısında yıkım ürünleri ortaya çıkar. Bu metabolitlerden malonil dialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenol gibi aldehid yapısındaki ürünler serbest radikal aktivitesiyle paralel artış gösterirler. Lipid peroksidler dokuda nötrofil birikimi ile indirekt hasarı da tetiklerler (104).

Nötrofiller direkt migrasyonla reperfüzyona uğrayan dokuda birikirler. Aktive nötrofiller elastaz, jelatinaz, kollajenaz gibi enzimler salgırlar ve bunlar da endotel hücrelerinin devamlılığının bozulmasına neden olurlar. Vasküler endotel bütünlüğünün kaybolması iskemi-reperfüzyon hasarında kilit roldedir. Endotel bütünlüğünün bozulması sonucu ortaya çıkan sitotoksik araçlar ile mikrovasküler geçirgenlik artar. Mikrovasküler geçirgenliğin artışına bağlı interstisiyel alana sıvı kaçıışı sonuçta da interstisiyel ödem ve hemokonsantrasyon meydana gelir. Buna bağlı olarak da kapiller lümen daha da daralır ve perfüzyon bozulur (104, 105). Mikrovasküler hasarlanma olması, nötrofillerin ortamda bulunmasına ek olarak endotele adezyon göstermelerine de bağlıdır. Nötrofil-endotel adezyonu zedelenme etkeni olan ajanların yüksek konsantrasyona ulaşmasını tetikleyen mikro ortam oluşumuna neden olur (104). Reperfüzyon hasarındaki adezyon mekanizmalarının önemi hayvan deneylerinde nötrofil adezif glikoproteinler üzerinde (CD11, CD18, integrinler) gösterilmiştir. Monoklonal antikolar kullanılarak reperfüze dokuda nötrofil birikimi ve bunların da endotele adezyonu önlenabilmektedir. Lökosit sayısında azalma ve lökosit adezyonunun inhibisyonu ile mikrovasküler geçirgenlik artışı düzelmekte, hücrel hasar önlenmeye çalışılmaktadır. Adezyon nedeniyle serbest radikallerin, proteazların ekstraselüler ortama salınması sonucunda oluşan hasar tetiklenir. Dokuda nötrofil birikimi dokunun miyeloperoksidaz aktivitesi ölçülerek yapılabilmektedir. Miyeloperoksidaz enzimi nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınır ve indirekt olarak nötrofil birikimine işaret eder (104, 106).

2.5.5. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarında Patolojik Değişiklikler

İskemik nöronal değişiklikler dört ana evre olarak incelenmektedir. Birinci evrede perikaryumda vakuolizasyonun görüldüğü mikrovakuolizasyon dönemidir. Bu dönemde nükleus normal veya hafif küçülmüştür, nükleolus normal görünümündedir ve hücre büyüklüğünde belirgin farklılık gözlenmez. Solunum ve oksidatif fosforilasyon ile ilgili enzim kompleksleri mitokondri yerleşimli olduğundan iskemide en erken etkilenen bölümlerden birisi mitokondrilerdir. Bu bilgileri destekler nitelikte de mikrovakuolizasyon evresindeki mikrovakuollerin hemen hepsi şişmiş mitokondrilerdir. İkinci evrede hücre şişer, stoplazmasındaki koyu boyanan protein içeriğinde artış gözlenir, nükleus üçgen şeklini alıp küçülerek kenara doğru itilir. Üçüncü evrede hücre gövdesinde boşluklar oluşur, bu evrede membran hasarı gelişmiştir. Dördüncü evrede nöronlar homojen bir görünüme bürünürler ve parçalanırlar. Bu evreden sonra da artık materyaller fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (107).

2.5.6. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarının Sınıflandırılması

Serebral iskemik stok (inme) heterojen bir grup olup birkaç ana hastalık ve tıkanma grubu şeklinde sınıflandırılabilir (21). Bu gruplar:

1. Büyük Damar Aterotrombotik Tıkanması: İnternal karotid, vertebral arter, baziler arter gibi büyük veya orta derece büyük damarlarda gözlenir. Bu tük tıkanma karotid arter aterosklerozuna benzer şekilde aterosklerotik plağın büyüyerek damar duvarını daraltması, kopma sonucu trombüs oluşumu ve distalinde tıkanma oluşumu safhaları vardır. Hiperkoagülopatilere bağlı olan formunda aterosklerotik lezyon olmayabilir (21).
2. Küçük Damarların Laküner Tıkanması (Laküner Strok): İskemik strokların %40'ını oluşturur. Perforan arterlerin vaskülopati, hipohyalinozis gibi patolojilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Derin subkortikal alanlardaki küçük infarktlara nedeni olur. Bu infarktların çevresindeki alanlara lakün denir (21).

3. Kardiyoembolik Tıkanma: Serebrovasküler tıkanmalardaki payı yaklaşık %20'dir. Arteria cerebri media ve vertebrobaziler sistem dalları gibi orta çaplı vasküler yapılardan kaynaklanır. Atriyal fibrilasyon bu patoloji için ana etkindir (21).
4. Diğer: Etiyolojisi saptanamayan akut veya kronik iskemik strokların yaklaşık %20'sidir. Damar disseksiyonu, vaskülit, venöz tromboz, fibromusküler displazi, Moya Moya gibi hastalıklar nedenler arasında değerlendirilmektedir (21).

Sınıflama klinik bulgulara göre de yapılabilir. Klinik değerlendirme iskemi derecesi, iskemik bölge hacmi, etkilenen bölgenin fonksiyonel özellikleri, etkilenme süresine gibi parametrelere göre yapılmaktadır. En sık görülen semptom başağrısıdır (%25). Alanın genişliğine göre yaygın veya fokal iskemi şeklinde sınıflandırılabilir. İskemiye en duyarlı bölgeler hipokampus piramidal hücreleri ve serebellar purkinje hücreleridir (53). Tıkayıcı damar hastalıkları nedeni ile karşılaşılan klinik tablolar dört ana başlıkla incelenebilir (21):

1. Transient (Geçici) İskemik Atak (TIA): Nörolojik semptomlar fokaldır, 24 saatten kısa süren geçici lezyonlardır. Süre genellikle 10-15 dakika kadardır. Karotid-vertebral, kardiyal tromboemboli en sık nedenlerdir. TIA'nın tekrarlayıcı olması veya şiddeti ilerdeki başka klinik antitelerin habercisi olabileceğinden dikkatli değerlendirilmelidir.
2. Geri Dönüslü İskemik Nörolojik Defisit: Nörolojik semptomlar 24 saatten uzun sürer ve 3 haftadan kısa sürer. Kardiyolojik emboli sıklıkla altta yatan nedendir. Tam strok riski yüksek bir klinik tablodur.
3. İlerleyici Strok: Fokal iskemik semptomlar dakikalar, saatler içinde kötüleşir. Klinik başlangıçta etkilenen alanın genişlemesine bağlıdır, genellikle 48 saat sürer. Orijin vertebrobaziler sistem ise süre 48-96 saat arasında değişebilir.
4. Tamamlanmış Strok: İskemik nörolojik defisit stabil hale gelmiştir. Embolik strok gelişimi ani başlar, maksimum defisit gelişimi hızla gerçekleşir ve iyileşme süreci saatler ile aylar arasında değişir. Trombotik olan strok da ani

gelişimli olarak başlar, sıklıkla tamamlanmış strok ve nörolojik defisit ile uykudan uyanırlar.

Diyabetik veya hipertansif olmayan 40 yaş altı yetişkinlerde strok ihtimali düşüktür, gerçekleşmesi halinde kardiyak nedenler düşünülmelidir. Uyuşturucu madde kullanımı, arteriyel diseksiyon, fibromuskuler displazi, koagülasyon bozuklukları da bu grup için diğer faktörler olabilir.

2.5.7. Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarında Tedavi Yöntemleri

İskemi durumunda serebral kan akımının arttırılması “iskemik penumbra” için önemlidir. İskemik penumbra yaşamı devam eden ancak fonksiyon göremeyen nöronların olduğu bölümdür ve bu gruplar düzelebilmek şansına sahip olduğundan akut serebral iskemi durumunda tedavi protokolüne hızla karar verilmesi ve uygulanmaya başlanması önemlidir. Serebral iskemi tedavisinde ana prensipler tanının konulması ve etyolojinin erken saptanması, reversible evrede hastalığın yakalanması, patogeneze göre spesifik tedavinin planlanması, iskemiyi ağırlaştırıcı veya komorbid olan durumların da tedavi edilmesi üzerine kuruludur (21). Tedavi seçenekleri arasında cerrahi, medikal ve endovasküler yöntemler bulunmaktadır.

2.5.7.1 Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavinin üç ana alt başlığı vardır.

1.Endarterektomi veya Tromboembolektomi: Servikal stenotik veya ülsere lezyonlar (karotis veya vertebral arter) için uygulanır. Acil karotid endarterektomi ile ilgili birçok çalışma literatürde mevcuttur. Bu bilgilerin bir kısmı ciddi infarktüsü olan hastalarda kan akımının ani düzeltilmesinin konjesyon, akut beyin ödemi ve kanamalara yol açabileceği yönündedir (108). Hafif veya orta derecede defisiti olan hastalarda ilk 24 saatte yapılan trombektomilerde iyi sonuçlar alındığı gözlenmiştir (109, 110).

2.Ekstrakraniyal-İntrakraniyal Damarlar Arası By-pass: Bu yöntemin kullanıldığı akut strok olgularında olumlu sonuçlar alınmamış, hatta ciddi kanama sorunları ile karşılaşmıştır (111).

3.Cerrahi Dekompresyon: Yaygın ödemin eşlik ettiği geniş hemisferik infarktın olduğu olgularda cerrahi dekompresyon (kraniyektomi) yapılabilir (112).

2.5.7.2. Endovasküler Tedavi

Son zamanlarda popülaritesi birçok patolojinin tedavisinde artmakla beraber rekanalizasyona yönelik yapılan çalışmalarda uzun dönemli, çok merkezli, olgu sayısı çok olan serilerin sonuçları halen raporlanmamıştır. Kullanılan endovasküler teknikler arasında direkt mekanik balon anjiyoplasti, mekanik kateteryel trombektomi, intravasküler stent uygulaması, lazer yardımcı tromboliz, emme “suction” tromboliz, “power assisted doppler tromboliz” sayılabilir. Endovasküler tekniklerin güvenliği ve etkinliği ile ilgili geniş ve kontrollü bilgiler literatürde halen bulunmamaktadır (113-115).

2.5.7.3. Medikal Tedavi

Birçok hastalık grubunda olduğu gibi strokta da önleyici tedavi önemli bir bölümdür. Strok için risk faktörlerinin önlenmesi (hipertansiyon, atriyal fibrilasyon vb. sistemik ve metabolik hastalıklar, fiziksel inaktivite vb.) durumunda strok oluşma riski ve oluşan stroktaki ölüm ve sakatlık olasılığı azaltılabilmektedir (108, 116, 117). Strokta önleyici tedavinin bir başka parametresi de altta yatan nedenlerin tedavisidir. Kalp veya vasküler kaynaklı hastalıkların uygun yöntemle tedavi edilmesi önemlidir (21).

Strok önleyici tedavisinin medikal tedavi kısmında TIA ve hafif strok tiplerini geçirmiş hastalarda olası strok riskinin azaltılması için gereken tıbbi tedavinin uygulanması önerilmektedir. Bu grup hastalarda antikoagülan kullanımı rutin olarak

önerilmemektedir. Ancak atriyal fibriliasyonlu hastalarda kullanılmaktadır. Antikoagülan seçenekler aspirin, ticlopidin, klopidoğrel, dipiridamol sayılabilir (22, 118). Akut iskemik strok geçiren hastalarda acilen gereken medikal başlanmalıdır. Altta yatan neden çoğunlukla ateriye tromboembolik tıkanma olduğundan iskemik alanı oluşturan trombusun arındırılması, alanın reperfüzyonu açısından desteklenmesi temel amaç olmalıdır. Penumbra'nın fonksiyonlarını tekrar kazanabilmesi ile ilgili sınırın kimi çalışmalarda 4 saat, kimi çalışmalarda da 12-17 saat arasında olduğu belirtilmektedir (119).

Serebral iskemisinin tedavisinde kan basıncının yükseltilmesi, volüm ekspansiyonu, antikoagülasyon, antiagregan tedavi, steroid tedavisi, hiperventilasyon, hiperosmolar sıvı tedavisi, mannitol tedavisi, kalsiyum antagonistleri, trombolitik tedavi, nöroleptik tedavisi, prostasiklin tedavisi, serebral metabolizmanın azaltılması, hipotermi, kolloid sıvı tedavisi seçenekleri bulunmaktadır.

Kan basıncının yükseltilmesi, iskemik serebral doku hipoperfüze olduğundan kan akımının düzenlenmesi açısından önemlidir. Bu tedavinin komplikasyonu olarak da hemoraji sık görülmektedir ve özellikle iskemik tahribat alanı geniş olan hastalarda tehlikelidir (120).

Volüm ekspansiyonu yapan ajanların kullanılmasının özellikle akut serebral iskemisi olan hastalarda iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir (120).

Antikoagülasyon amacı ile heparin ve kumadin türevleri kullanılmaktadır. Strok hastalarında antikoagülan kullanımı hala tartışmalı bir konudur. Fokal iskemik patolojilerde tromboz oluşumunu engellemesi ve embolizasyonu azaltması nedeni ile kullanılmaktadır. Kardiyak embolilerde de kullanımı önemlidir. Akut progresif tablolarda antikoagülan kullanımı defisit'in progresyonunu yavaşlatabilmektedir. Antikoagülan tedavinin en önemli komplikasyonlarından olan kanama %5-%15 arasında görülebilmektedir (121, 122).

Antiagregan tedavide aspirin ve dipiridamol oral yolla kullanılabilir. Aspirin tromboksan A2 sentezini baskılayarak etkisini gösterir. Dipiridamol, adenosin difosfat (ADP) salınımını baskılayarak etkisini gösterir. Bu iki ajanın bir arada

kullanılması ile sinerjistik etki elde edilmekte ve trombosit kümelenmesi azaltılabilmektedir.

Steroid tedavisi ile infarkt alanı değiştirilemez ancak çevresel ödem ve intrakraniyal şift oluşumu azaltılabilir. Steroidler fokal iskemi tedavisinde rol alabilirler (123).

Hiperventilasyon özellikle intrakraniyal basınç arttığında ve iskemi sonrası ödem gelişimi durumunda gerekli olabilir. Hiperventilasyonla intrakraniyal basınç ancak geçici bir süre için düşürebilir ve etkisi kısa sürelidir. Hiperventilasyonun akut serebral iskemi deneysel hayvan çalışmalarında ve kontrollü insan çalışmalarında faydası gösterilememiştir (40, 123).

Hiperosmolar solüsyon seçenekleri arasında hipertonic salin ve mannitol en sık kullanılanlardır. Mannitol plazma osmolaritesini arttırarak; intravasküler kompartmandan dışarı sıvı çıkışı önlenir, kan viskozitesi ve hemotokrit konsantrasyonu azalır ve buna bağlı direkt vazodilatasyonla kan akımının mikrosirkülasyonu düzeltilmiş ve lokal serebral kan akımı arttırılmış olur. Mannitolün iskemik ödemi arttırıcı etkileri, hidrofilik serbest radikal temizleyici işlevleri de vardır. Mannitol moleküler özellikleri nedeni ile metabolize olmaz, kan beyin bariyerini geçemez. Mannitolün beyin omurilik sıvısı yapısını azaltma, serebral oksijen kullanımını arttırma yönünde etkileri de vardır (123).

Kalsiyum iskemi sürecinde hücre içinde birikme eğilimindedir. Bu birikime bağlı olarak araşidonik asit ve diğer serbest yağ asitlerinin artışı, fosfolipaz enzim aktivasyonu gibi etkilere yol açar. Bu sürecin sonunda da nöronal mitokondrial aktivite bozulma sürecine girmekte, ATP ve dolayısı ile hücrenin enerji potansiyeli azalmaktadır. Bu mekanizmalardan dolayı kalsiyum antagonistleri farklı etiyolojilere bağlı iskeminin tedavisinde seçenekler arasındadır (124, 125).

Trombolitik tedavi ile literatürde hala birçok farklı değerlendirme bulunmaktadır. Bazı kaynaklar streptokinaz, ürokinaz gibi trombüsü eriterek vasküler pasajı açabilecek ajanların kullanılması önermekte; bazı kaynaklar ise hasta iyileşmesinde olumlu etkileri olmadığını kötü sonuçlarla karşılaştığını ifade

etmektedir. Birçok yeni ajan ile ilgili olarak halen güvenli araştırmalar mevcut değildir ve kullanımları tartışmalıdır (116, 118).

Literatürde nöroleptiklerin serebral dokuda vazodilatasyon ve bölgesel kan akımında artış etkilerinden dolayı serebral iskemide kullanılmasını öneren çalışmalar mevcuttur.

Serebral metabolizmanın barbituratlar gibi ajanlarla azaltılmasının nöroprotektif faydası olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

Hipoterminin tedavideki rolü ile ilgili çalışmalarda genel olarak iyi sonuçlar alınmakta beraber klinik çalışmalarla desteklenmemiştir (126).

2.5.8. Beyin İskemi-Reperfüzyon Modelleri

Serebral iskeminin tedavi ve patofizyolojik olarak sistemli çalışılabilmesi için fizyolojik olarak kontrol edilebilir, tekrarlanabilir in vivo hayvan modelleri kullanılmalıdır. Bunun bazı nedenleri vardır:

- 1) İnsan iskemik inmesinin manifestasyonunda, nedenlerinde anatomik yerleşimlerinde çok çeşitlilik vardır; bu farklılıklar tam doğru analiz tipinin ve kontrollü hayvan preparatlarının kontrolünü zorlaştırmaktadır.
- 2) Özenli histopatolojik, biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalar, invazif cerrahi teknikler ve beyin dokusuna direkt ulaşım gerektirmektedir.
- 3) İlk saniyeden dakikalara kadar oluşan iskemik hasar sadece hayvan laboratuvarlarında çalışılabilir.
- 4) İskeminin kalbinde abnormal perfüzyon yatmaktadır; bunu çalışabilmek için doku kesitleri, nöronal/glial hücre kültürleri gerekmektedir.

Rodentlerin beyin iskemi çalışmalarında kullanılmasının temel nedeni ucuz fiyatları, gerekli işlemler sırasındaki maliyet azlığı, rölatif olarak soy içi homogeniteleri, serebrovasküler anatomilerinin ve fizyolojilerinin üst türlere yakın olması, küçük beyin ölçülerinin in vivo tekniklere ve biyokimyasal analizlere uygun

olması, ekolojik ve etik nedenlerden ötürü üst türler ile karşılaştırıldığında geniş kabul görürlüğüdür (127).

2.5.8.1. Serebral İskemide Rodent Modelleri:

Literatürde kabul görmüş ve rutin kullanıma geçmiş modellerin başlıcaları şunlardır (127).

2.5.8.1.1. Ratlarda Global Serebral İskemi Modelleri

- 1) Forebrain iskemisi için iki damar oklüzyonu modeli (hipotansiyona ek olarak transiyent bilateral a. carotis communis (CCA) oklüzyonu).
- 2) Forebrain iskemisi için dört damar oklüzyon modeli (kalıcı vertebral arter oklüzyonuna ek olarak transiyent bilateral CCA oklüzyonu).
- 3) Artmış BOS basıncı içeren iskemi modelleri (bihemisferal forebrain kompresyon-iskemi, unihemisferal forebrain iskemi)
- 4) Çeşitli global islemi oluşturan stratejiler (boyun turnikesi, boyunun kesilmesi)
- 5) Levine'in hipoksi-iskemisinin hazırlanması ve modifikasyonları.

2.5.8.1.2. Ratlarda Fokal Serebral İskemi Modelleri

- 1) A.cerebri media (MCA) oklüzyonu ve varyantları
- 2) Hipertansif ratlarda spontan inme
- 3) Fotokimyasal olarak indüklenmiş fokal serebral tromboz
- 4) Serebral embolizm ve trombozda çeşitli modeller (kan pıhtı embolizasyonu, mikrosfer embolizasyonu, fotokimyasal olarak başlatılmış

tromboembolizm, araşidonat indüklenmiş ‘‘arachidonate induced’’
tromboembolizm)

2.5.8.1.3. Gerbillerde Serebral İskemi Modelleri

1) Unilateral CCA oklüzyonu

2) Bilateral CCA oklüzyonu

2.5.8.1.4. Forebrain İskemisi İçin İki Damar Oklüzyonu Modeli

Bu modelin temelinde forebrain kan akımını önemli derecede düşürmeye yetecek şekilde sistemik hipotansiyon ile bilateral CCA oklüzyonu yatmaktadır. Son zamanlarda dört damar oklüzyon modeline alternatif olarak popülaritesi artmaktadır. Her iki CCA oklude edilmekte ve kan basıncı kontrollü arteriyel kanama ile 50 mm.Hg.’ya kadar düşürülmektedir. Trimethaphan veya fentolamin hipotansiyon oluşturmakta kullanılabilir. Postiskemik resikülasyon sonucunda heterojen hipoperfüzyon olduğu tanımlanmaktadır. Bu model hipokampusun CA1 piramidal nöronları, kaudoputamen, neokorteks gibi selektif olarak etkilenebilir yapılarda iskemik hücre değişikliklerine neden olmaktadır. Bu modelin histopatolojisi dört damar oklüzyon modeline benzemektedir. Literatürdeki çalışmalara göre 2 dakikalık iskemide hipokampal CA1 ve CA4 piramidal hücreleri ve subikulum etkilenebilir. İskemi süresi 4 dakika olursa neokorteks, 8-10 dakika olursa kaudoputamen ekilenmektedir. Bazı çalışmalarda modelin uygulanması sırasında rektal ısı takibi yapılmış olmasına rağmen bazı çalışmalarda da rektal ısı takibinin önemsenmediği belirtilmektedir (127). Literatürde sistemik hipotansiyon uygulanmadan iki damar oklüzyon modelinin global iskemi yaratmak için sıklıkla kullanıldığı ancak posterior dolaşımdan gelen artmış akımı dengelemek için iskemi süresinin daha uzun tutulmasının önerildiği ile ilgili bilgiler mevcuttur (128).

2.5.9. İnsan Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı: Deneysel Modeller ile Benzerlikleri ve Farklılıkları

İskemik strok karmaşık bir patofizyolojiye sahip yıkıcı gücü yüksek bir hastalıktır. Hayvan modelleri iskemik strokta meydana gelen iskemik serebral hasar mekanizmasını araştırmak için zorunlu bir araç olmak dışında yeni antiiskemik ajanlar geliştirilmesi konusunda da önemli role sahiptir. Strok modellerinin çoğu rodentler üzerinde geliştirilmekle birlikte daha az sıklıkla köpekler, kediler ve primatlar gibi daha gelişmiş memelilerde de hayvan modelleri geliştirilmiştir. Geliştirilen modellerin her birinin kendisine özgü güçlü yanları olduğu gibi zayıf yanları da mevcuttur. İskemik strok oldukça heterojen bir patoloji olduğundan, insan strokundaki patolojileri tüm yönlerini tek bir hayvan modelinde gerçekleştirmek mümkün değildir. Deneysel iskemik strok modelleri iskemi ve ardından reperfüzyona uğrayan beyin dokusundaki olayların anlaşılması ve araştırılmasında önemlidir (129, 130).

Rodent beyni lissensefalik bir yüzeye sahiptir ve insan beyni ile karşılaştırıldığında ayrı beyaz ve gri madde yapılarına sahiptir. Rodent ile insan immün sistemleri arasında belirgin farklar mevcuttur. Ratlarda strok sonrasında infiltre olan nötrofil yaygınlığı gözlenirken bu durumda insanlarda makrofaj infiltrasyonunda yaygınlık gözlenmektedir. Bu ve buna benzer farklara rağmen gerbiller dışında çoğu rodent türü insan dolaşımındaki gibi tam bir Willis poligonu oluşumuna sahiptir. Serebral dolaşım yapısındaki bu benzerlikler sayesinde rodentlerde yapılan deneylerle insanda meydana gelen strok ile benzerlikler kurularak strok ve serebral kan akımı çalışmaları yapılabilmektedir. İnsanlar ve hayvanlardaki temel beyin bölgeleri benzer olduğundan beynin strok sonrası iyileşme ve plastik adaptasyon sürecini kavramakta bu modeller yardımcı olabilmektedir. Buna benzer cesaretlendirici özelliklerine rağmen bu modellerle elde edilen bazı sonuçlar hayvan fizyolojisi ve uygulanan ajanlara özellikle hedef organlarda verilen fizyolojik yanıtın farklılıkları nedeni ile insanlarda benzer sonuçlar doğurmayabilmektedirler. Literatürde özellikle N-metil-D-aspartat (NMDA) ile ilgili çalışmalarda bu problem tartışılmaktadır ve bazı araştırmacılar tarafından da hayvan modellemeleri ile insan strok tedavisinin geliştirilemeyeceği yönünde görüşler ileri

sürülmektedir. Bu durumun aksine Amerika Birleşik Devletleri'nde insan akut serebral iskemisinde onay almış olan doku plazminojen aktivatörü (tPA) ilk olarak tavşan modellerinde gösterilmiş ve hayvan modellemeleri sayesinde klinik hayata uyarlanmış başarılı örnekler de mevcuttur (128).

2.6. Minosiklin

Literatürde serebral iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır ve bu konu ile ilgili birçok ajan ve grup incelenmiştir. Bu ajanlardan bir tanesi de minosiklidir. Minosiklin ikinci kuşak yarı sentetik bir tetrasiklidir. Klinik yaygın kullanımı antibakteriyel özelliklerine bağlıdır. Minosiklin yüksek lipofilik özelliğe sahip, moleküler ağırlığı 493,94 olan, uzun etkili ve kan-beyin bariyerini geçebilen bir ajandır (131, 132).

2.6.1. Minosiklinin Farmakokinetik Özellikleri

2.6.1.1. Minosiklinin Emilimi

Minosiklinin oral biyoyararlanımı %95-100 arasında değerlendirilmekte olup doz artırımı ile biyoyararlanımda artma elde edilmez. Minosiklinin 150 mg.lık ve 300 mg.lık formlarının alınması sonrasında yaklaşık üçüncü saatte birinci form için 2 mg./L ve ikinci form için 4 mg./L olarak ölçülen maksimum serum konsantrasyonuna ulaşıldığı değerlendirilmiştir. Minosiklinin 100 mg.lık dozlar halinde 12 saat ara ile uzun süre kullanılması sonrasında kararlı durum konsantrasyonunun 2.3 ve 3.5 mg./L arasında değiştiği gözlenmiştir. Hayvan modellerinde minosiklinin 25 mg./kg. dozunda i.v. olarak verilmesinin ardından 1. saatte beyin dokusunda saptandığı ve 2-4 saat arasında plazma düzeyinin %35'i olan doruk konsantrasyonuna ulaştığı ve 8 saatlik bir süre boyunca ilk saat sonrasındaki düzeyini koruduğu bildirilmiştir. İnsan beyin omurilik sıvısındaki minosiklin konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun yaklaşık %25-30 kadardır (132, 133).

2.6.1.2. Minosiklinin Dağılımı

Minosiklin yüksek lipofilik yapıya sahiptir. Bu yapı moleküle vücut dokularına iyi dağılım özelliği verir. Minosiklin tetrasiklinler arasından en lipofilik yapıya sahip olan molekül durumundadır. Dağılım hacmi 1.14 ile 1.64 L/kg. arasında değişir. Minosiklinin plazma proteinlerine bağlanma orası %70-80 arasında olarak değerlendirilmektedir (131, 133).

2.6.1.3. Minosiklinin Metabolizması

Minosiklinin biyotransformasyonu büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşir. Yarılanma ömrü 16-18 saat olan minosiklinin metabolitleri hem idrar hem de feçes ile atılır. Minosiklinin 3 metaboliti bulunmaktadır. Bu metabolitler arasında en önemli ve fazla bulunanı 9-hidroksi-minosiklindir. Diğer metabolitler 9-hidroksi-minosiklin molekülünün 4. ve 9. pozisyonlarında demetilasyonla oluşurlar (131, 132).

2.6.1.4. Minosiklinin Atılımı

Minosiklin ana molekülünün %8 ile %12 arası idrar yolu ile %25 ile %35 arası fekal yol ile atılır. Minosiklinin metabolitleri de idrar ve feçes yolu ile atılır. Molekülün renal klirensi 0.13 mL./dk./kg. olarak bildirilmekte olup toplam klirensi yaklaşık olarak 1.05 mL./dk./kg.dır. Metabolizasyonunun karaciğerdeki kısmından sonra kısmen safra içine sekrete edilir. Safra içerisindeki moleküller intestinal lümene ulaştıklarında polivalent metal bileşikleriyle şelat oluştururlar ve süreç inaktivasyon ile sonuçlanır. Şelat türevi moleküller suda çözünmediklerinden absorbe edilemezler ve feçes yolu ile atılımları gerçekleşir. Minosiklinin atılımını etkileyebilen ana faktörler arasında yaş, cinsiyet, gebelik, laktasyon, fizik aktivite sayılabilir (132, 133).

2.6.2. Minosiklinin Nöral Dokular Üzerindeki Etkileri

Literatürde serebral iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır ve bu konu ile ilgili birçok ajan ve grup incelenmiştir. Bu ajanlardan bir tanesi de minosiklidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda minosiklinin yerleşik antimikrobiyal özelliklerine ek olarak nöroprotektif özellikleri de olduğu gözlenmiştir.

Tüm beyin iskemisi modeli uygulanmış deney hayvanlarında bu ajanın hipokampal nöronlarda nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Fokal serebral iskemi modeli uygulanmış deney hayvanlarında ise infarkt alanında anlamlı ölçüde küçülme olduğu gösterilmiştir. Minosiklinle ilgili hücre kültürü çalışmaları da yapılmış olup bu çalışmalarda glutamat aracılı nörotoksisiteyi azalttığı bildirilmiştir. Fokal serebral iskemi modeli uygulanan çalışmalarda minosikline ek olarak orta derecede hipoterminin de deney koşullarına eklenmesi durumunda bu modifikasyonun minosiklinin etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir. Rodentlerde neonatal dönemde yapılan hipoksik-iskemik beyin hasarlanması modellerinde nöroprotektif etkinlik elde edildiği literatürde gözlenmektedir (133, 134)

Minosiklinin epilepsi, Huntington Hastalığı, Parkinson Hastalığı, amiotrofik lateral skleroz (ALS), multiple skleroz (MS), fokal ve global serebral iskemi, travmatik beyin hasarı, omurilik zedelenmesi gibi hastalık modellerinde nöroprotektif etkinlik gösterdiği birçok farklı çalışmada tartışılmıştır (12).

Minosiklinin özellikle Parkinson Hastalığı modelinde mikrogliya aktivasyonunu belirgin olarak inhibe ettiği, NO aracılı nörotoksisiteyi direkt olarak inhibe ettiği ve dopaminerjik nöronlar üzerinde nöroprotektif etki gösterdiği ile ilgili bilgiler literatürde bulunmaktadır (135, 136). Minosiklinle yapılan omurilik zedelenmesi sonrası mitokondriyal sitokrom-c salınımını inhibe ederek işlev yetersizliğini azalttığı raporlanmıştır (137). Nöron kültürlerinde düşük doz iyonize radyasyon kullanılarak yapılan çalışmalarda apoptotik süreçte nöronları apoptozisden koruduğu bildirilmiştir (138).

Özetle minosiklinin mikrogliya aktivasyonunu; immün hücre aktivasyonunu; ard arda gelen sitokin, kemokin, inflamasyonun lipid mediyatörleri, matriks

metalloproteinaz ve nitrik oksid (NO) salınımını modüle ederek potent anti-inflamatuvar etki gösterdiği literatürde gösterilmiştir (13, 14)



3.GEREÇ VE YÖNTEM

“Sıçanlarda Minosiklinin Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmanın cerrahi prosedürleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (M.K.Ü. D.A.M.) laboratuvar ve ameliyathanelerinde gerçekleştirildi. Alınan örneklerin ışık mikroskobu ile yapılacak olan patolojik incelemeleri M.K.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji A.D. laboratuvarlarında, beyin parenkimi ve serumda yapılacak biyokimyasal incelemeler M.K.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmada 200-250 gr. ağılığında olan erişkin erkek Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları M.K.Ü.D.A.M.’da bulunan standart laboratuvar koşulları altında; 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22 santigrad derece oda ısısı, %50-%60 arası nem sağlanarak barındırıldı. Deney hayvanlarına yiyebilecekleri kadar serbest olarak su ve yiyecek verildi. Sıçanlar her grupta 8 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve toplam 24 sıçan kullanılarak çalışma gerçekleştirildi.

Deney hayvanlarının gruplandırılması rastgele seçim yöntemi ile yapıldı ve 3 grup oluşturuldu.

1.Grup: Kontrol-sham grubu (B), 8 adet sıçandan oluşmakta. Bu gruba genel anestezi uygulandı. İntrakardiyak yolla 5-6 cc. kan alındı ve kardiyak kanatma

yöntemi ile deney hayvanı öldürüldü. Dekapitasyon yapıldı, kranyotominin ardından beyin dokusu ve serebellum çıkarıldı.

2.Grup: İskemi-reperfüzyon grubu (M), 8 adet sıçandan oluşmakta. Bu gruba genel anestezi uygulandı. Genel anestezi altında n.vagus, CCA'den uzaklaştırıldıktan sonra atravmatik klemp ile bilateral CCA oklüzyonu yapıldı, oklüzyon süresi 20 dakika olarak ayarlandı. Oklüzyon süresinin

bitiminde atravmatik klemler açılarak rekanalizasyon ve beynin reperfüzyonu sağlandı, reperfüzyon süresi 20 dakika olarak ayarlandı. Reperfüzyon süresinin bitiminde intrakardiyak yolla 5-6 cc. kan alındı ve kardiyak kanatma yöntemi ile deney hayvanı öldürüldü. Dekapitasyon yapıldı, kranyotominin ardından beyin dokusu ve serebellum çıkarıldı.

3.Grup: Minosiklin + iskemi-reperfüzyon grubu (K), 8 adet sıçandan oluşmakta. Bu gruba cerrahi uygulanacağı günden 48 saat, 24 saat ve 1 saat önce toplam üç doz olarak, her bir dozu 90 mg./kg. olacak şekilde orogastrik tüp aracılığı ile minosiklin (Minocyclin-ratiopharm 100 mg Hartkapseln; ratiopharm GmbH Graf-Arco Str.3 D-89079 Ulm, Almanya) uygulandı. Son doz minosiklinden 1 saat sonra bu gruba da genel anestezi uygulandı. Genel anestezi altında n.vagus, CCA'den uzaklaştırıldıktan sonra atravmatik klemp ile bilateral CCA oklüzyonu yapıldı, oklüzyon süresi 20 dakika olarak ayarlandı. Oklüzyon süresinin bitiminde atravmatik klemler açılarak rekanalizasyon ve beynin reperfüzyonu sağlandı, reperfüzyon süresi 20 dakika olarak ayarlandı. Reperfüzyon süresinin bitiminde intrakardiyak yolla 5-6 cc. kan alındı ve kardiyak kanatma yöntemi ile deney hayvanı öldürüldü. Dekapitasyon yapıldı, kranyotominin ardından beyin dokusu ve serebellum çıkarıldı.

3.1. Anestezi Tekniği

Her üç grup sıçana da intraperitoneal 10 mg./kg. Xylazin hidroklorür (Trompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve intraperitoneal 75-100 mg./kg. Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) kullanılarak genel anestezi sağlandı.

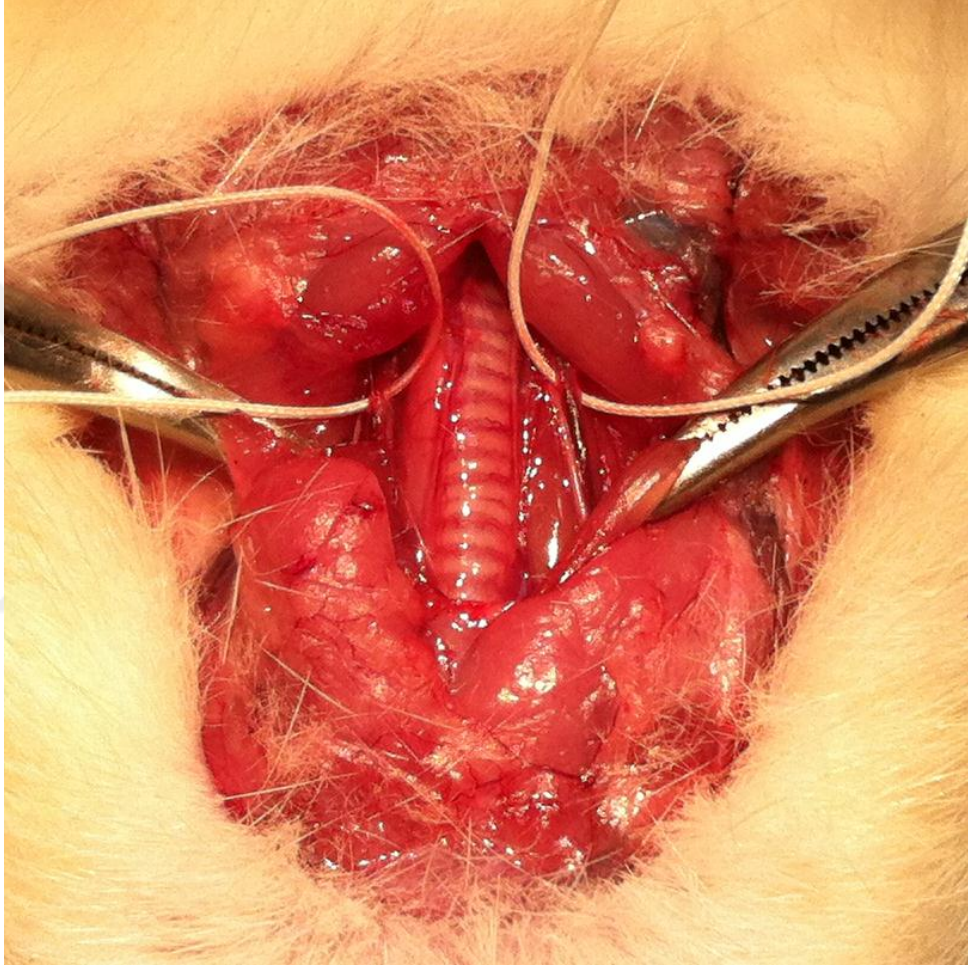
3.2. Cerrahi Teknik ve Beyin İskemi-Reperfüzyon Modeli

Sham grubundaki deney hayvanlarına intraperitoneal Xylazin hidroklorür ve Ketamin ile genel anestezi sağlandı, kuyruk ve ayaklarından ağırlı uyaran vermek yoluyla kontrol edildi. İntrakardiyak yolla 5-6 cc. kan biyokimya tüpüne alındı ve ardından kardiyak kanatma yöntemi ile deney hayvanları öldürüldü, dekapitasyon yapıldı. Yapılan kranyotomi ile beyin ve serebellum dokusu çıkarıldı. Orta hatta korpus kallozum üzerinden yapılan kesi ile iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan birisi patoloji laboratuvarlarına gönderilmek üzere %10 formaldehit içine kondu. Diğer parça yıkanarak alüminyum folyo ile sarılarak kuru buz ile dondurulduktan sonra -80 derecede derin dondurucuya yerleştirildi. Biyokimya tüpüne alınan kanın santrifüj sonrası ayrılan serumu ependorf tüpüne alınarak -80 derecede derin dondurucuya yerleştirildi.

Minosiklin + iskemi-reperfüzyon uygulanan ve iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplardaki deney hayvanları intraperitoneal Xylazin hidroklorür ve Ketamin uygulaması sonrasında ameliyat masasına supine pozisyonda baş ekstansiyonda yerleştirildi. Cerrahi sırasında asepsi ve antisepsi kurallarına uyuldu. M.K.Ü. D.A.M.'daki mikroskop kullanılarak mikroskop altında boyun ön bölgesinde cilt ve ciltaltı dokular geçildikten sonra orta hatta kas grubu içinde künt diseksiyonla ilerlendi ve trakea bulundu. Ardından trakeanın her iki yanında yer alan dokular ekarte edilerek a.carotis communisler ortaya kondu. CCA'lar ile birlikte seyreden n.vaguslar mikrodiseksiyonla CCA'lardan ayrılarak ekarte edildi ve ardından atravmatik klempler ile her iki CCA oklüde edildi.

Bilateral CCA'lar oklüde edildikten sonra 20 dakika beklendi ve bu yolla beyin dokusu iskemik bırakıldı. Süre tamamlandıktan sonra atravmatik klempler çıkarılarak beynin reperfüzyonu sağlandı ve 20 dakika reperfüzyon için beklendi. Sürenin tamamlanmasından sonra genel anestezi altındaki deney hayvanlarından intrakardiyak yolla 5-6 cc. kan biyokimya tüpüne alındı ve ardından kardiyak kanatma yöntemi ile deney hayvanları öldürüldü, dekapitasyon yapıldı. Yapılan kranyotomi ile beyin ve serebellum dokusu çıkarıldı. Orta hatta korpus kallozum üzerinden yapılan kesi ile iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan birisi patoloji laboratuvarlarına gönderilmek üzere %10 formaldehit içine kondu. Diğer parça

yıkılarak alüminyum folyo ile sarılarak kuru buz ile dondurulduktan sonra -80 derecede derin dondurucuya yerleştirildi. Biyokimya tüpüne alınan kanın santrifüj sonrası ayrılan serumu ependorf tüpüne alınarak -80 derecede derin dondurucuya yerleştirildi. Tüm analizler 30 gün içerisinde yapılarak deney tamamlandı.



Resim 5: Boyun diseksiyonu sonrası cerrahi alan. Beyaz sütür ile asılı bilateral CCA ve bilateral medialinde daha beyaz renkli n.vagus gözlenmekte.



Resim 6: Bilateral olarak atravmatik klemp ile oklüde edilmiş CCA'lar.

3.3. Patolojik İnceleme

‘‘Sıçanlarda Minosiklinin Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi’’ başlıklı bu çalışmanın patolojik değerlendirme bölümleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda yapılmıştır.

Tüm deney hayvanlarının dekapitasyon sonrasında kranyotomi ile çıkarılan ve korpus kallozumdan geçecek şekilde iki eşit parçaya bölünen eşit serebral hemisfer doku örneklerinden biri %10’luk formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit edildikten sonra sagittal kesitler alınarak kasetlendi ve rutin takip işlemleri yapıldı.

Parafin bloklara gömülen bu dokulardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyandı. Boyanan örneklerde ışık mikroskobu ile 200 büyük büyütmede 50 alan incelendi. Dokularda vakuolizasyon, konjesyon ve eozinofilik dejenerasyon Uzar ve arkadaşlarının, Feng ve arkadaşlarının çalışmalarından modifiye edilerek değerlendirildi (139).

Tablo 1: Çalışmada kullanılan modifiye histopatolojik skorlama sistemi.

	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Vakuolizasyon	0	1	2	3
Konjesyon	0	1	2	3
Eozinofilik Dejenerasyon	0	1	2	3

İstatistiksel analiz için SPSS programı (SPSS v15.0 for Windows) kullanıldı. Sonuçlar ortalama +/- standart hata şeklinde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi ve posthoc LSD testi kullanıldı. $P < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4 Biyokimyasal İnceleme

3.4.1. Dokularda Homojenizasyon İşlemleri

3.4.1.1. Dokuların Çıkarılarak Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Kranyotomi yapıldıktan sonra biyokimyasal testler için alınan serebral hemisfer hemen soğuk izotonik su ile yıkandı. Alüminyum folyoya sarılarak kuru buz ile donduruldu ve -80 santigrad derecede derin dondurucuda biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana kadar saklandı. Alınan kanlar 1500 x g devirde 15 dakika

santrifuj edilerek serumları ayrıldı ve serumlar ependorf tüplerine aktırılarak numaralandı ve -80 santigrad derecedeki derin dondurucuda testin yapılacağı zamana kadar saklandı.

3.4.1.2. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Homojenizasyonda kullanılacak olan reaktifler PH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu; 0.2 mM olarak hazırlanan Tris solüsyonu ve HCl solüsyonu 50 / 39.9 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlandı. Tüm çalışmalarda bu tampon kullanıldı. Miyeloperoksidaz enzim tayininde kullanılacak süpernatanın elde edilmesi için ise % 0.5'lik hexadecyltrimethyl ammonium bromid, doku ağırlığının 5 katı olacak şekilde ilave edilerek 16000 devir/dakika hızda 2 dakika homojenize edildi.

3.4.1.3. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Yaş ağırlıkları 1 gr olarak ayarlanan dokular soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla küçük parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi sonrasında son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edildi. Oluşan materyal tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarıldı ve tüplerin üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan NO ve MDA tayinleri yapıldı.

Elde edilen homojenatlar 3220 rpm / 30 dakika +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifuj edilerek süpernatın elde edildi. Ayrılan süpernatınlardan CAT, GSH-Px, XO ve protein tayinleri yapıldı. Süpernatın 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) vortekslenip cam tüpte 3220 rpm / 40 dakika +4°C'de santrifuj edildi (140). Materyalin üstünde oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

3.4.1.4. Ekstraksiyonlu ve Ekstraksiyonsuz Numunelerde Protein Tayini (Lowry Metodu)

3.4.1.4.1. Deneyin Prensibi

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Oluşan bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur (141). Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10 da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilâve edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

3.4.1.4.2 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Bu deneyde kullanılan kimyasal maddeler CuSO_4 , Na_3Sitrat , Na_2CO_3 , NaOH ve Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifidir.

3.4.1.4.3. Deneyde Kullanılan Reaktifler

A reaktif: Bu reaktifin hazırlanışında 0.5 gr. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 gr Na_3Sitrat (susuz) 100 mL distile suda çözülür.

B reaktif: Bu reaktifin hazırlanışında 20.0 gr. Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH , 1 L distile suda çözülür.

C reaktif: Bu reaktifin hazırlanışında 50.0 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi ilave edilir (Taze hazırlanmalıdır). A ve B reaktifleri hazırlandıktan sonra, numune sayısına göre C reaktifi hazırlanıp bekletilmeden kullanılmalıdır.

D reaktifi: (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): Bu reaktifin hazırlanışında 1500 mL’lik bir balon jojeye 100 gr sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 gr sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 700 mL distile su, 50 mL %85 fosforik asit ve 100 mL konsantre hidroklorik asit (HCl) konulur. Bu karışım 10 saat geri soğutucu altında yavaşça ısıtılır.

Karışım soğuduktan sonra üzerine 100 gr lityum sülfat, 50 mL distile su ve 5 damla brom ilave edilir (reaktifler asla teneffüs edilmemelidir). En son eklenen maddelerden sonra 15 dakika kaynatılarak bromun fazlası uçurulur (bu kaynatma havalandırılmalı bir yerde ağzı açık olarak yapılır). Karışım soğuduktan sonra 1 L’lik balon jojeye aktarılır ve distile su ile 1 L’ye hacim tamamlanır.

Reaktif koyu renkli cam şişede 1-2 yıl oda ısısında saklanabilir. Elde edilen reaktifin rengi normalde sarı olur. Eğer yeşil renk oluşmuş ise reaktif bozulmuş demektir. Protein ölçümünde kullanılırken 1 / 1 (v / v) oranında distile su ile seyreltilmelidir. Bu metod biüre metodunun geliştirilmiş şekli olup daha hassastır ve Lowry Metodu olarak adlandırılır.

3.4.1.4.4. Deneyin Yapılışı

Deney yapılırken ağzı kapanan mika 5 mL’lik tüpler kullanılarak aşağıdaki miktarlarda ve sürelerde hazırlanan materyal değerlendirilir.

Tablo 2: Lowry metodu

Lowry Metodu	KÖR tüpü	NUMUNE tüpü
Numune (μL)	-	10
Distile su (μL)	500	490
C reaktifi (μL)	2500	2500
D reaktifi (μL)	250	250

Karıştırılır, 10 dakika beklenir.

Tüpler vortekslenir, 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 700 nm’de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okunur.

3.4.1.4.5. Değerlerin Hesaplanması

Protein (mg/mL) = grafikten okunan değer x F

F (faktör) = standart hacmi (0.5 mL) / numune hacmi (0.010mL) = 50

Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliğine göre distile su hacminde azaltma yapılarak materyal tüplere pipetlenir. Standart hacim (numune + distile su) 500 µL olacak şekilde hazırlanmalıdır.

3.4.1.4.6. Protein Standart Grafiğinin Çizimi

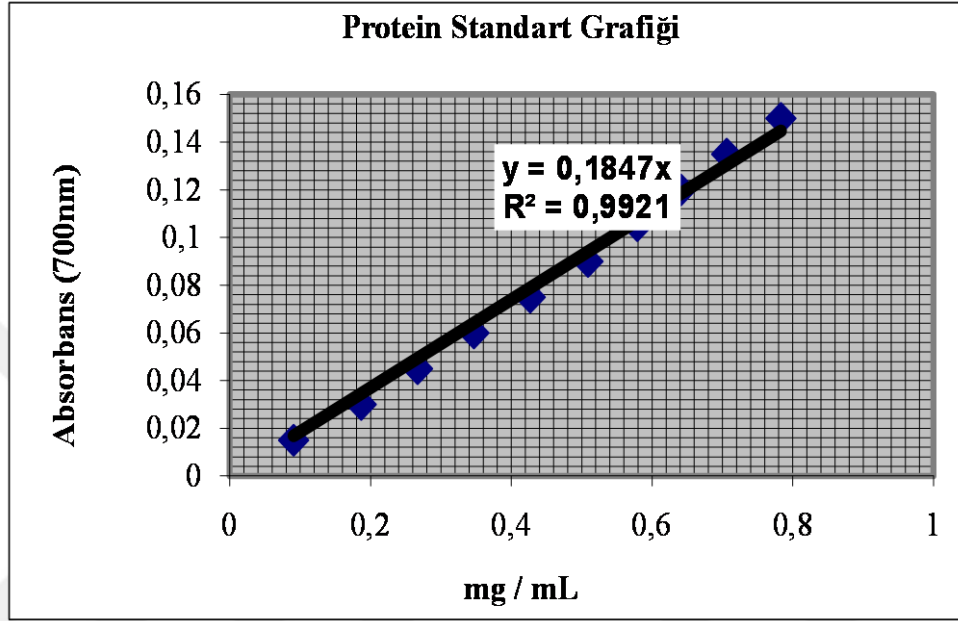
Tablo 3: Protein Standart Grafiğinin Çizimi

Tüp numaraları (Proplen Tüpler)	KÖR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Standart protein çözeltilisi (mL)	-	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Distile su (mL)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	-
C reaktifi (mL)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Karışımlar alt-üst edilerek karıştırılır, 10 dakika oda ısısında beklenir.											
D reaktifi (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Karışımlar ağzı kapalı olarak karıştırılır, 20-30 dakika 25 °C’de bekletilir ve 700 nm’de köre karşı okunur. Köre karşı değerleri okunduktan sonra OD – konsantrasyon (mg. protein/mL) grafiği çizilir.

3.4.1.4.7. Protein Standart Grafiği

Standart grafiği çizmek için konsantrasyonunu bilinen Bovin serum albumi kullanarak hazırlanan çözeltiler kullanıldı. “Optik dansite (OD) – mg / mL protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek numunelerin protein değeri bu grafikten okundu.



Şekil 10: Protein standart grafiği.

Hesaplama denklemi olarak $y = 0.1847x$ kullanıldı.

3.4.2.Biyokimyasal Analizler

3.4.2.1. Superoksit Dismutaz (Total) Enziminin Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesinin ölçülmesi Sun ve arkadaşlarının metoduna (140) ve Durak ve arkadaşlarının tariflediği modifikasyona (142) göre ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) ortamdaki NBT’yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Oluşan bu kompleks 560 nm’de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT

indirgenmesi olmaması nedeniyle mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzim bulunmayan (Kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılır.

Hesaplama:

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak değerlendirilmektedir. Sonuçlar doku için U/mg protein, eritrosit için U/gr Hb, plazma için U/mL olarak ifade edilir.

3.4.2.1.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune(AN)}] / (\text{AK}) \times 100$$

% 50'lik İnhibisyona 1 Ü denildiği için;

$$\%50 \text{ İnhibisyon} = (\% \text{ İnhibisyon} / 50) \times 1 / 0.1 = \ddot{\text{U}} / \text{mL} = (\text{AK}-\text{AN})/\text{AK} \times 20 = \text{Spesifik aktivite (SA)'} \text{ dir.}$$

Birimi Plazma için: $\ddot{\text{U}} / \text{mL}$,

Doku için: $\text{SA} / (\text{mg protein} / \text{mL}) = (\ddot{\text{U}}/\text{mL}) / (\text{mg protein}/\text{mL}) = \ddot{\text{U}} / \text{mg protein}$.

Örnek Hesaplama:

$$0,3 \text{ mmol} / \text{L Xanthine} : (\text{M} = \text{m} / [\text{mw} \times \text{V (L)}] \text{ den; } \text{m} = \text{M} \times \text{mw} \times \text{V(L)} = 93/1000 \times 152,1 \times 4 \times 10^{-2} \rightarrow \text{m} = 1,825 \text{ mg alınır. 40 ml. d. suda çözülür.}).$$

Sonuç: 0.00913 g/200 mL distile su.

Deneyin yapılışı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4 : SOD deney şeması

	Total-SOD Deney Metodu		Yarım Hacim Çalışılırsa	
	Kör (mL)	Numune (mL)	Kör (µL)	Numune (µL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85	1425	1425
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10	-	50
Bidistile su	0.10	-	50	-
167 U/L XO	0.05	0.05	25	25
Kör tüpüne enzim ilâvesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatılır 25 °C'de 20 dakika inkübasyon sonu hemen;				
0.08 mM/L CuCl ₂	1	1	500	500

İlavesi ile reaksiyon durdurulur. Bu işlemler bittikten sonra distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm.'de okunur.

3.4.2.2. Katalaz (CAT) Enziminin Aktivite Tayini

3.4.2.2.1 Deneyin Prensibi

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (143). Hidrojen peroksit (H₂O₂) 240 nm'de maksimum absorbands verir. Deney ortamına ilave edilen H₂O₂, katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendisini ultraviyole spektrumda absorbands azalması şeklinde göstermektedir. Absorbandtaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir:



3.4.2.2.2. Kullanılan Reaktifler

Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM)

H₂O₂ çözeltisi: Absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponu olup; yaklaşık 300 mL pH 7, 50 mM olan fosfat tamponu renkli kaba (plastik, cam olabilir) aktarılır. Spektrofotometre fosfat tamponuna göre sıfırlanıp renkli kaptaki tampona 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilave edilir. Karışımın optik dansitesi (OD) 0.500 nm oluncaya kadar devam edilir ve ara ara karıştırılır.

3.4.2.2.3. Deneyin Yapılışı

Deneyin gerçekleştirilebilmesi için fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H₂O₂ çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlanılır.

Tablo 5 : CAT deney şeması

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ çözeltisi	0.01	2.99
Süpernatan	-	0.01

Numune ilavesi ile quartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve hemen küvet alt-üst edilerek absorbans okunur (10 kadar sayarak standardize edilir). Absorbans azalması her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir. Aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn'de bir kayıt yapılabilir. Takiplerde lineer azalma tespit edilirse okuma bitirilebilir. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (OD₁) ve en düşük (OD₂) değerleri esas alınır.

3.4.2.2.4. Değerlerin Hesaplanması

İlgili değerlerin hesaplanması aşağıdaki eşitliğe göre gerçekleştirilir.

$$K = [2.3 \times \log (OD_1 / OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$K/\text{mg protein} = k / [(\text{mg/mL protein}) \times 1000]$$

3.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivite Tayini

3.4.2.3.1. Deneyin Prensibi

GSH-Px (EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (GSH-Px-Lit1). Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'nin $NADP^+$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.



Enzim Ünitesi: Birim zamanda okside olan NADPH'nin mikromol miktarıdır.

3.4.2.3.2. Kullanılan Reaktifler

GSH-Px Tamponu (pH 7, 50 mM Fosfat Tamponu + 5 mM EDTA'lı) :

(1000 mL pH 7, 50 mM fosfat tamponu + 2.08 gr EDTA-Na tuzu)

[3.2 M $(NH_4)_2SO_4$ (Amonyum Sülfat)] : 4.224 g alınır $\rightarrow$ 10 mL distile suda çözülerek hazırlanılır.

[150 mM redükte Glutasyon (GSH)] : 50 mg alınır, $\rightarrow$ 1 mL GSH-Px tamponunda çözülerek hazırlanılır.

[8 mM redükte NADPH]

[1 M NaN_3 (Sodyum Azid)] : 65 mg alınır $\rightarrow$ 1 mL GSH-Px tamponunda çözülerek hazırlanılır.

[GSH-Redüktaz enzimi] : [1.5 mL 3.2 M $(NH_4)_2SO_4$ + 50 μ L GSH redüktaz (EC)]. Numune sayısına göre hesaplanmalıdır ve 1.5 mL ile 150 numune çalışılabilir.

[2 mM Hidrojen Peroksit (H_2O_2)] : 15 μ L H_2O_2 $\rightarrow$ 5 mL GSH-Px tamponuna pipetlenilerek hazırlanır.

3.4.2.3.3. Deneyin Yapılışı

GSH-Px deneyinin yapılışı aşağıdaki şemaya göredir.

Tablo 6 : GSH-Px deney şeması

	Numune (mL)
Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM) 5 mM EDTA'lı	2.650
150 mM Redükte GSH	0.100
8 mM NADPH	0.100
GSH-Redüktaz	0.010
1 M NaN ₃	0.010
Numune	0.020
30 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından	
2 mM H ₂ O ₂	0.100

Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri 5 dakika boyunca kaydedilir. Kayıtlar sırasında lineer aktivitede azalmanın olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapılır.

3.4.2.3.4. GSH-Px Aktivitesinin Hesaplanması

Hesaplama kullanılan eşitlikler aşağıdaki gibidir.

$$\text{Hesap: IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

ΔA = OD değişimi, denklemdaki t = zamanı (dk), W = enzim çözeltisinin protein miktarını (mg/mL) ifade etmektedir.

$$\text{NADPH} = 6.22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}.$$

3.4.2.4. Malondialdehid (MDA) Miktarının UV Spektro İle Tayini

3.4.2.4.1. Deneyin Prensibi

Malondialdehid miktarının UV spektro ilte tayini EDTA'lı kan örneklerinden çalışılmaktadır.

3.4.2.4.2. Deneyin Yapılışı

Deneyin yapılış sistemetağı aşağıda tarıflendiğı şekildedir.

% 10'luk triklorasetik asit (TCA): 10 gr TCA al → 100 mL distile suya tamamlanır.

% 0.675'lik tiobarbitürik asit (TBA) 0.675 gr TBA al → 100 mL distile suya tamamlanır.

Materyaller hazır olunca bir deney tüpüne (vidalı kapaklı, 10 mL olan) 2.5 mL % 10'luk triklorasetik asit (TCA), üzerine 0.5 mL numune (plazma, homojenat, eritrosit pelletinin 5 kat dilüe olan) ilâve edilerek 3-5 sn. vortekslenir.

Tablo 7: MDA deney şeması I

10 mL'lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü	Numune tüpü
% 10'luk TCA (mL)	2.5	2.5
Numune (mL) (plazma, homojenat, 5 kat dilüe eritrosit)	-	0.5
Distile su (mL)	0.5	-

Karışım 3-5 sn vortekslelendikten sonra tüp ağzı kapatılarak 90 °C'de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyonun ardından materyal soğuk çeşme suyu ile soğutulur. Soğutulan materyal 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir (süpernatan).

Tablo 8: MDA deney şeması II

10 mL’lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü	Numune tüpü
Süpernatant (mL)	2	2
% 0.675’lik TBA (mL)	1	1

Elde edilen materyal vortekslendikten sonra tüpün ağzı kapatılarak 90 °C’de 15 dakika tekrar inkübe edilir. İnkübasyonun ardından soğuk çeşme suyu ile soğutulur. Soğutulmuş materyal 532 nm’de köre karşı okunur.

3.4.2.4.3. Malondialdehid (MDA) Aktivitesinin Hesaplaması

TBA-MDA kompleksinin ekstinksiyon katsayısından ($1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) yararlanılarak nmol / mL cinsinden MDA değerleri hesaplanır.

3.4.2.5. Kreatin Kinaz (CK), Kreatin Kinaz-MB (CK-MB), Laktat Dehidrogenaz (LDH) Enzimlerinin Aktivite Tayini

CK ve LDH düzeylerinin tayini Roche firmasına ait Cobas-Integra 800 model otoanalizör cihaz kullanılarak gene Roche firması tarafından hazırlanan ticari test kasetleri ile spektrofotometrik yöntemle yapıldı.

CK-MB düzeyinin tayini Roche firmasına ait Cobas-Integra 800 model otoanalizör cihaz kullanılarak gene Roche firması tarafından hazırlanan ticari test kasetleri ile immünoinhibisyon yöntemi ile yapıldı.

3.4.2.6. Nitrik Oksit (NO) Miktarının Tayini

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak ifade edilmiştir (144). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrate (NO_3^-) dönüşür. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar meydana gelebileceğinden, Griess reaksiyonu ile ölçümlerde belli bazı sıkıntılar

yaşanmaktadır. Bu açıdan nonspesifik reaksiyonların önüne geçilebilmesi için homojenatlar önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçüldü. Zor olmakla birlikte in vivo olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO problemleri geliştirilmiştir ancak bu problemlerle in vitro/ex vivo şartlarda çalışılması mümkün değildir (145).

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir (146). Bu deneyde total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilmektedir. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri ve deproteinize numune (homojenat, serum, eritrosit) süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyon sonunda nitrat redüksiyonu sağlanmaktadır. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diamine (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlenmektedir. Sonuçta elde edilen nitrit konsantrasyonu ilk konsantrasyondan çıkarılarak nitrat miktarı belirlenmektedir.

3.4.2.6.1. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler:

Kadmiyum granülleri :(Cd, MERCK 1.02001.250, W=112.40 g/mol)

Glisin-NaOH Tamponu (pH 9.7) : Bu materyalin hazırlanması için 7.5 gr glisin 100 mL deiyonize suda çözülmesi gerekmektedir. Ardından 2 mol/L NaOH ile pH'sı 9.7'ye gelecek şekilde ayarlanır ve son hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlanır. Oluşan bu tampon +2-8 °C'de 1 ay saklanabilir.

Sülfanilamid: 5 gr sülfonilamid tartılır → 500 mL 3 M HCl içerisinde ısıtılarak çözülerek hazırlanılır. Oluşan solüsyon oda ısısında 1 yıl korunabilir.

N-Naphthylethylene daimine (NNDA) : 50 mg NNDA alınıp → 250 mL distile suda çözülerek hazırlanır.

5 mmol/L CuSO₄ Solüsyonu: 1.2434 gr CuSO₄ alınır → 1000 mL distile suda çözülerek hazırlanır.

0.1 mol/L H₂SO₄ Solüsyonu: 2.8 mL H₂SO₄ alınıp → hacim 500 mL'ye distile suyla tamamlanarak hazırlanır.

Standart solüsyonu: (0.1 mol/L NaNO₂ (Sodyum nitrit, W=69 gr/mol):

v0.345 gr NaNO₂ al → 300 mL 10 mmol/L Na₂B₄O₇ (W=381.4 gr/mol olup; 1.144 gr alınıp → 300 mL distile su ile tamamlanarak hazırlanır) içinde çözülerek hazırlanır.

75 mmol/L ZnSO₄

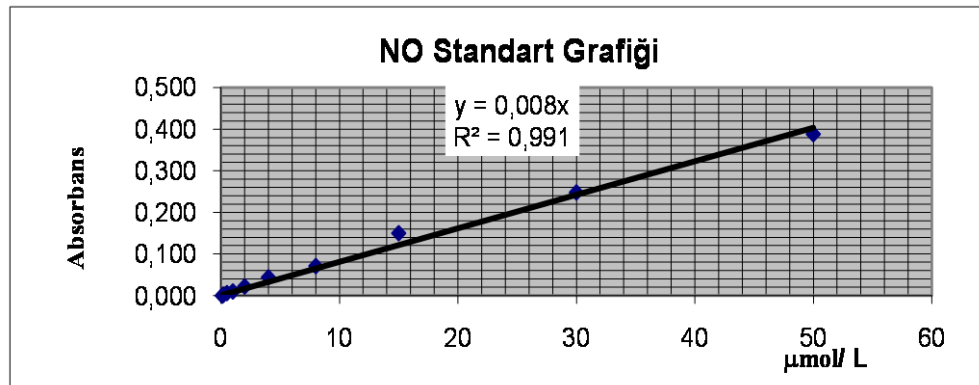
55 mmol/L NaOH

3.4.2.6.2. Nitrit Standart Grafiğinin Hazırlanması

Stok solüsyon: 0.1 mol/L KNO₃ hazırlanır (Oda ısısında 9 ay stabil olan bir solüsyondur).

Standart solüsyonları: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 4, 8, 15, 30, 50 µmol/L konsantrasyonlarda hazırlanır.

Hazırlanan standart solüsyonundan elde edilen “Optik Dansite (OD) – µmol/L” grafiği ile numune sonuçları hesaplanır (Grafik NO₁).



Şekil 11: Grafik NO₁, nitrit standart grafiği.

3.4.2.6.3. Kadmiyum (Cd) Granüllerinin Aktifleştirilmesi

Kadmiyumlar 2.5-3 gr olarak 20 cc kapaklı plastik tüplere dağıtıldıktan sonra aşağıdaki prosedür uygulanılır.

1. Granüller deiyonize su ile 3 defa yıkanır (süzgeç kağıdından süzdürülerek).
2. 1-2 dakika 5 mmol/L CuSO_4 solüsyonu içinde bekletilir ve solüsyon süzülerek dökülür (Cd'lar CuSO_4 ile kaplanarak siyah renkte görülürler).
3. Granüller 1-2 mL glisin tamponu ile yıkanarak aktive Cd'lar 10 dakika içinde deneyde kullanılır.
4. Granüller deneyde kullanıldıktan sonra distile su ile hemen yıkanır ve 0.1 mol/L H_2SO_4 solüsyonu içinde en az 1 gün ara ara alt-üst ederek karanlık ortamda saklanmalıdır. Cd'lar böylece gümüş gibi parlak renk alırlar. Tekrar aktifleştirmek için basamak 1'den işleme başlanılır.

3.4.2.6.4. Deneyin Çalışılması

Deproteinizasyon İşlemi: 500 μL numune + 2mL 75 mmol/L ZnSO_4 ile vortekslenir. 1.250 mL 55 mmol/L NaOH ilâve edilip tekrar vortekslenir [(200 μL numune + 800 μL 75 mmol/L ZnSO_4 vorteksle) + 1 mL 55 mmol/L NaOH vorteksle] ve 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Berrak süpernatant Nitrat tayininde deproteinize numune olarak kullanılır.

3.4.2.6.5. Nitrat Tayini

1. Glisin tamponu ile yıkanmış aktif kadmiyum granüllü tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu ilave edilir.
2. Üzerine 1 mL deproteinize numune ve 2 mL deiyonize su ilâve edilir, tüplerin ağzı kapatılır.
3. 90 dakika oda ısısında karanlık ortamda ara ara kadmiyumlu tüpler alt-üst edilerek inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonunda Nitrit Çalışma Tablosunda numune veya standart olarak kullanılır.

3.4.2.6.6. Nitrit Çalışma Tablosu

Tablo 9 : Nitrit çalışma tablosu

	Blank (mL)	Deprot. Sample (mL)	St1	St2	St3
Deproteinize Sample	-	2	-	-	-
St1	-	-	2	-	-
St2	-	-	-	2	-
St3	-	-	-	-	2
Distile H ₂ O	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sulfanilamid solüsyonu	1	1	1	1	1
N-Naphthylethylenediamine	1	1	1	1	1

Hazırlanan materyal vortekslendikten sonra 20-60 (45) dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 545 nm’de köre karşı okunarak sonuçlar elde edilir.

3.4.2.6. Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın nöron spesifik enolaz tayini Usen Life Science Inc. (Houston, Texas, USA) firmasına ait, E90537Ra ürün kodlu, ratlarda çalışılmak üzere geliştirilmiş ticari ‘‘enzyme-linked immunosorbent assay kit’’ kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan kitin algılama aralığı 0.625-40 ng/mL ve sensitivitesi 0.215 ng/mLdir.

Kitler okunurken Awareness Technology Inc . (Palm City, FL, USA) tarafından üretilmiş olan ChroMate Microplate Reader model okuyucu cihaz kullanıldı.

3.4.2.7. Protein S100B (S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein B) Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın nöron spesifik enolaz tayini Usen Life Science Inc. (Houston, Texas, USA) firmasına ait, E90567Ra ürün kodlu, ratlarda çalışılmak üzere geliştirilmiş ticari ‘‘enzyme-linked immunosorbent assay kit’’ kullanılarak

yapılmıştır. Kullanılan kitin algılama aralığı 31.2-2,000 pg/mL ve sensitivitesi 12.1 pg/mLdir.

Kitler okunurken Awareness Technology Inc. (Palm City, FL, USA) tarafından üretilmiş olan ChroMate Microplate Reader model okuyucu cihaz kullanıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

“Sıçanlarda Minosikinin Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı bu çalışmada elde edilen veriler SPSS paket programı (SPSS v15.0 for Windows) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Verilerin dağılımına göre one-way ANOVA testi kullanıldı; gruplar arası karşılaştırmalarda post-hoc LSD testi analiz için kullanıldı. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik olarak yapılan sınıflama ve değerlendirmede kontrol (sham) grubu, iskemi-reperfüzyon grubu (I/R), minosiklin + iskemi-reperfüzyon grubu (Mino+I/R) histopatoloji skorları ortalama değerleri arasından Kruskal-Wallis testi kullanılarak analizler yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmelerde vakuolizasyon açısından hem I/R grubu hem de I/R+Mino grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). I/R+Mino grubu ile I/R grubu arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$).

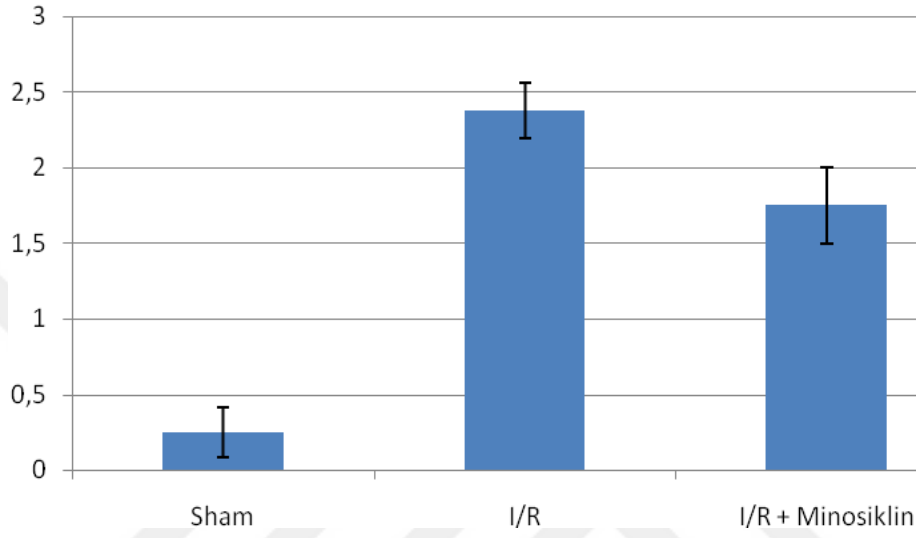
Konjesyon açısından hem I/R grubu hem de I/R+Mino grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). I/R+Mino grubu ile I/R grubu arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

Eozinofilik dejenerasyon açısından hem I/R grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). I/R+Mino grubu ile sham grubu arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). I/R+Mino grubu ile I/R grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

Işık mikroskobu görüntülemelerinde kontrol grubunda görülen normal histomorfolojik yapının iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda belirgin konjesyon (k), vakuolizasyon (v) ve eozinofilik dejenerasyon (ed) yönünde değişiklik gösterdiği gözlenmektedir.

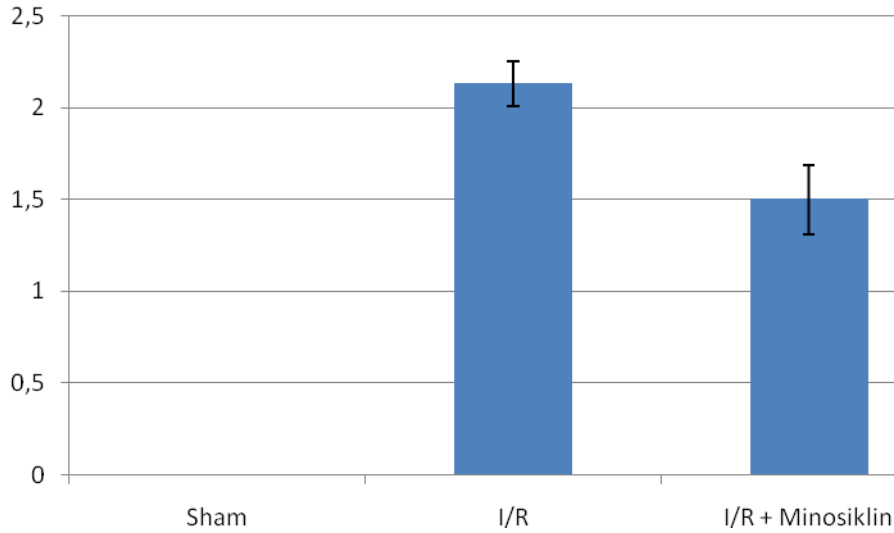
Işık mikroskobu görüntülemelerinde minosiklin+iskemi-reperfüzyon (Mino+I/R) grubu değerlendirildiğinde ise dejenerasyon bulgularında kısmi düzelme olduğu gözlenmektedir.

Konjesyon



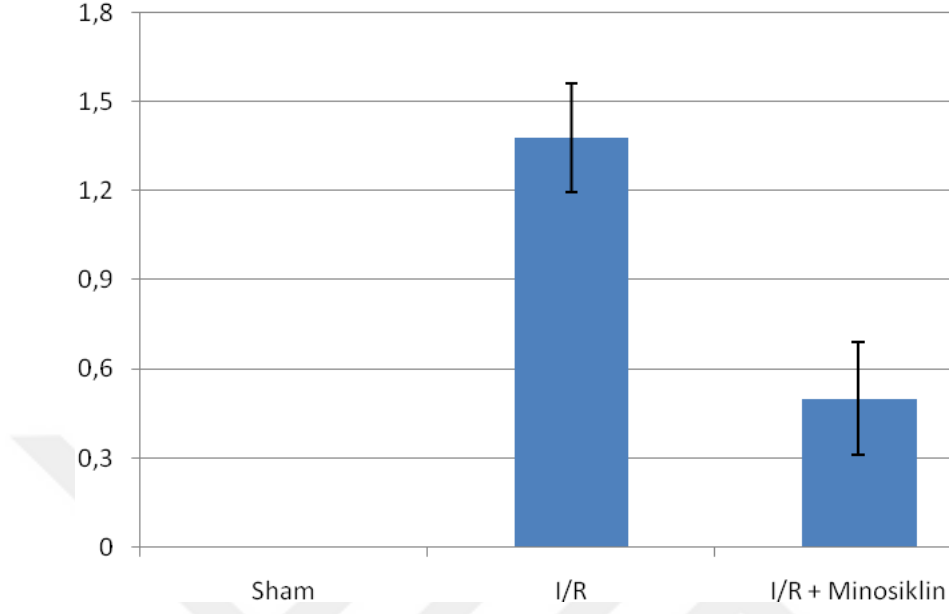
Şekil 12: Konjesyonun gruplara göre dağılımı.

Vakuolizasyon



Şekil 13: Vakuolizasyonun gruplara göre dağılımı.

Eozinofilik Dejenerasyon.

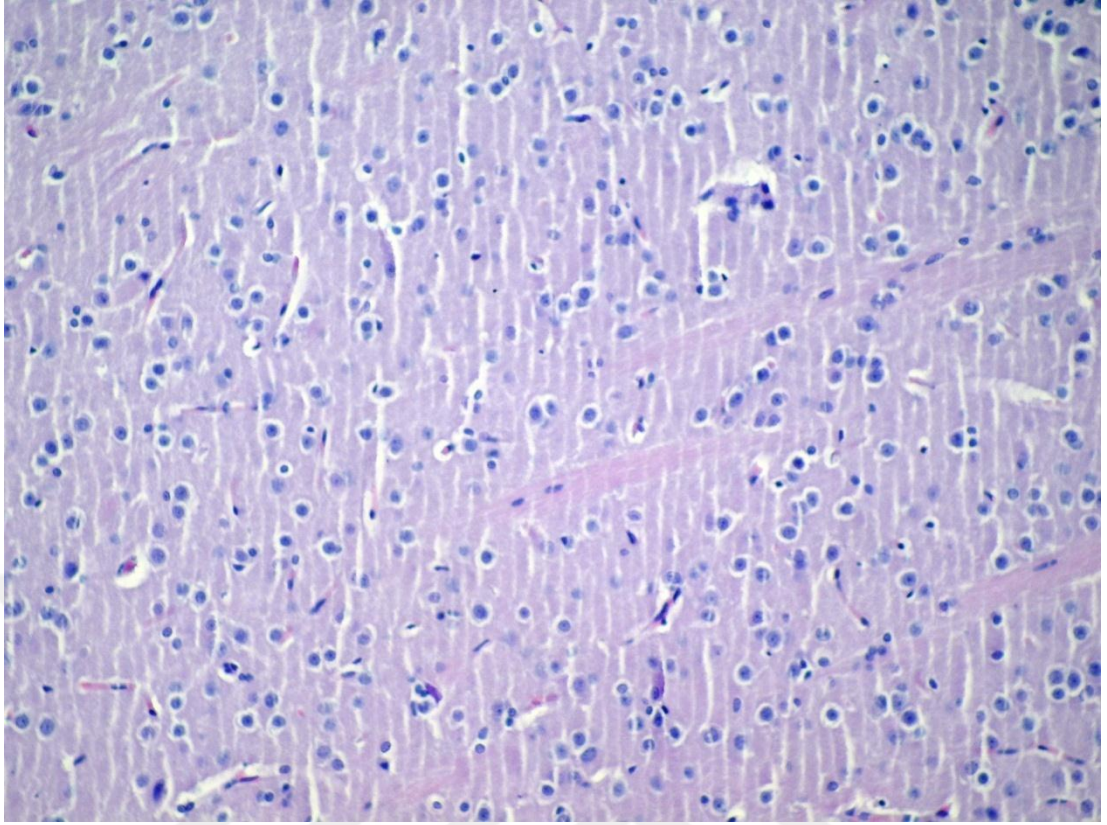


Şekil 14: Eozinofilik dejenerasyonun gruplara göre dağılımı.

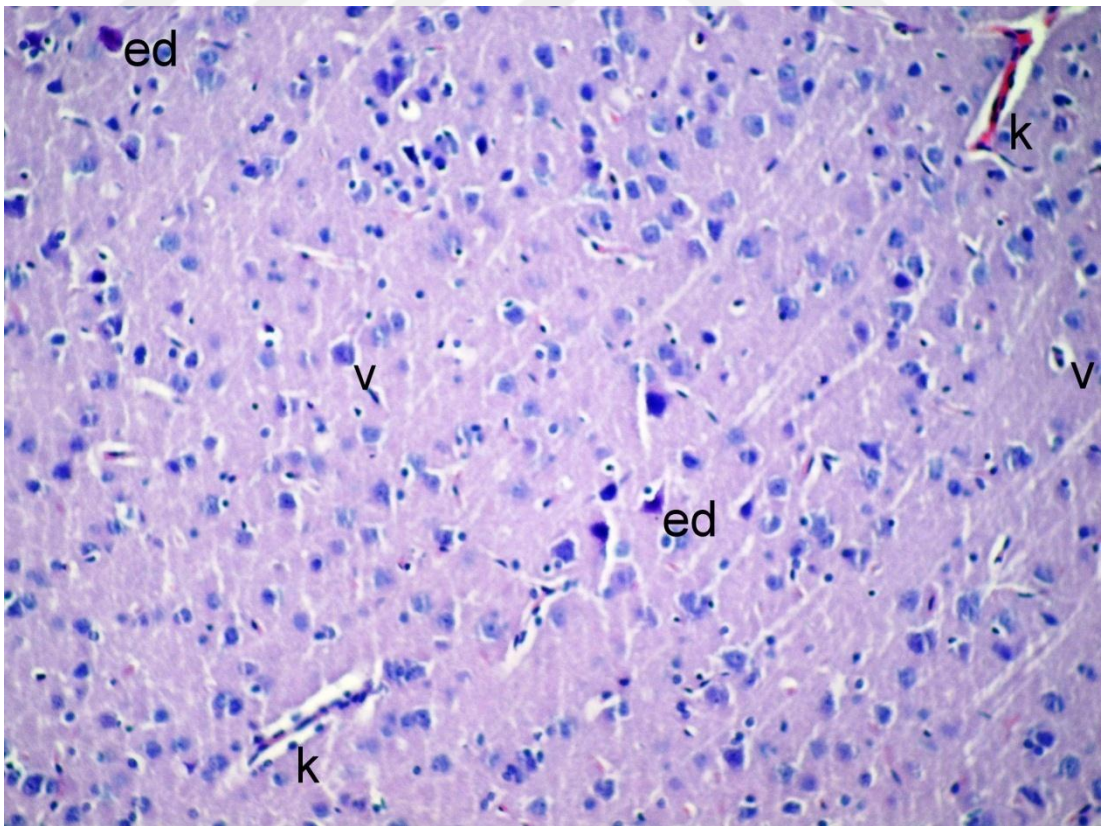
Tablo 10: Histopatolojik skorlamanın istatistiksel analizi

	Vakuolizasyon(I)	Konjesyon(II)	Eozinofilik D (III)
Sham	0	0,25±0,164	0
I/R	2,13±0,124 ^a	2,38±0,183 ^a	1,38±0,182 ^a
I/R + Mino	1,5±0,189 ^{a, b}	1,75±0,25 ^{a, c}	0,5±0,189 ^{b, d}

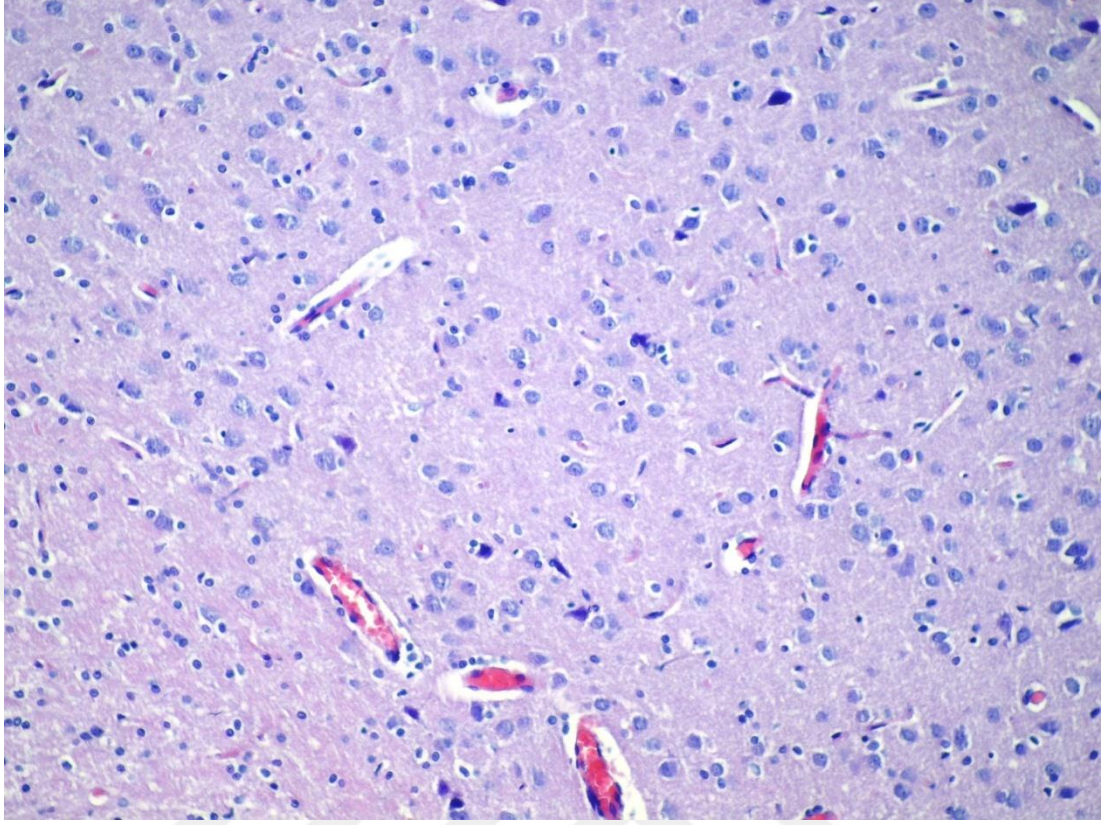
- (a) Kontrolle kıyaslandığında $p < 0.001$ düzeyinde anlamlılık var.
(b) I/R ile kıyaslandığında $p < 0.001$ düzeyinde anlamlılık var.
(c) I/R ile kıyaslandığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlılık var.
(d) Kontrolle kıyaslandığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlılık var.



Resim 7: Normal beyin dokusu.



Resim 8: Serebral dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı.



Resim 9: Minosiklin uygulaması sonrası iskemi-reperfüzyon hasarında dejenerasyon bulgularında gözlenen kısmi düzelme.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

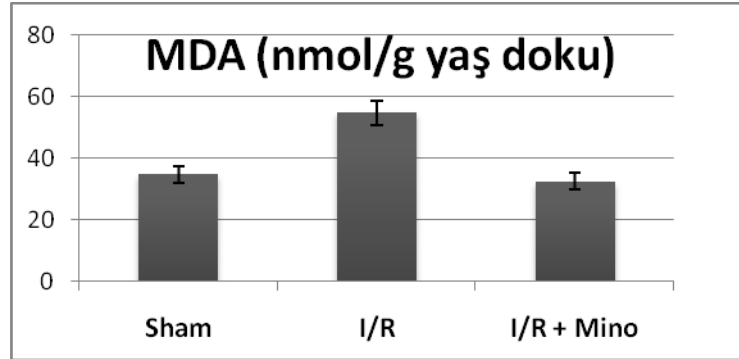
4.2.1. Malondialdehid (MDA) Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında MDA değerleri sham (kontrol) grubunda $34,610 \pm 2,7300$ nmol/g yaş doku, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $54,642 \pm 3,9584$ nmol/g yaş doku, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $32,432 \pm 2,7864$ nmol/g yaş doku olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik bulunmuştur ($p < 0.001$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark (yükseklik) bulunamamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 15 : MDA Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 11 : MDA Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
MDA (nmol/g yaş doku)	Sham	8	34,610	7,7217	2,7300
	I/R	8	54,642	11,1962	3,9584
	I/R + Mino	8	32,432	7,8810	2,7864
	Total	24	40,561	13,3965	2,7345

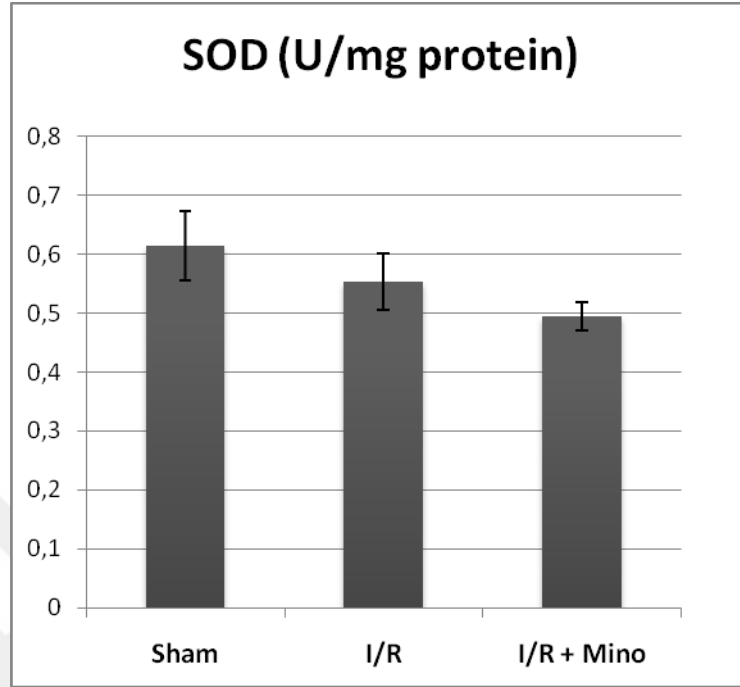
4.2.2. Superoksit Dismutaz (Total) (SOD) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında SOD değerleri sham (kontrol) grubunda $0,6141 \pm 0,05823$ U/mg protein, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $0,5534 \pm 0,04797$ U/mg protein, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $0,4944 \pm 0,02406$ U/mg protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 16 : SOD Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 12 : SOD Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
SOD (U/mg protein)	Sham	8	,6141	,16471	,05823
	I/R	8	,5534	,13567	,04797
	I/R + Mino	8	,4944	,06806	,02406
	Total	24	,5540	,13328	,02720

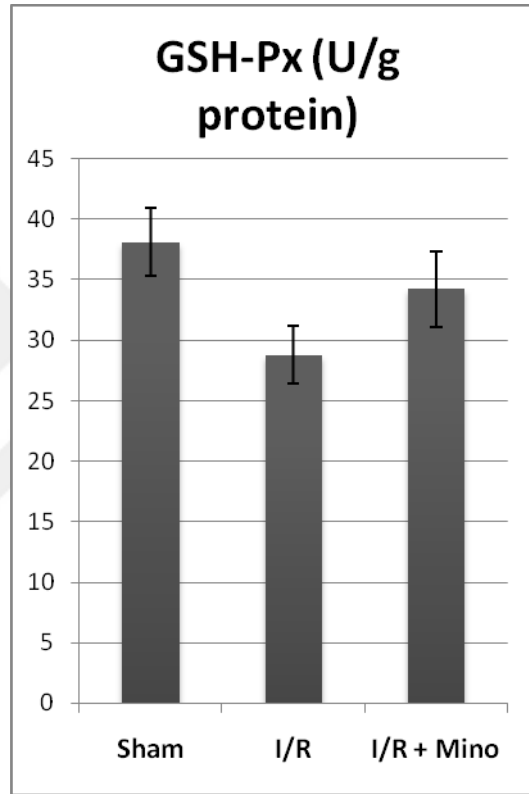
4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-PX) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında GSH-Px değerleri sham (kontrol) grubunda $38,146 \pm 2,8108$ U/g protein, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $28,795 \pm 2,4133$ U/g protein, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $34,230 \pm 3,0924$ U/g protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 17: GSH-Px Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 13 : GSH-Px Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
GSH-Px (U/g protein)	Sham	8	38,146	7,9502	2,8108
	I/R	8	28,795	6,8260	2,4133
	I/R + Mino	8	34,230	8,7467	3,0924
	Total	24	33,724	8,4878	1,7326

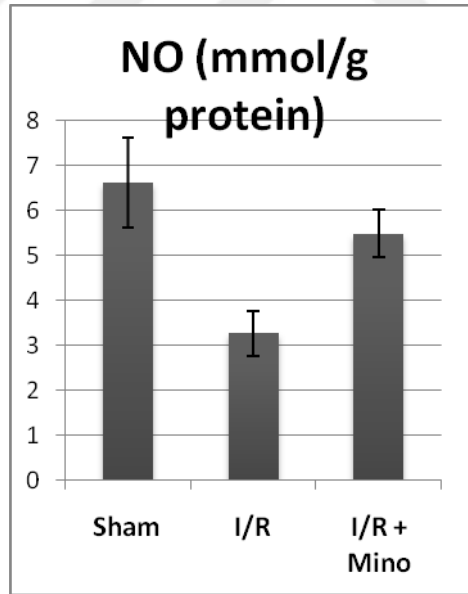
4.2.4. Nitrik Oksit (NO) Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında NO değerleri sham (kontrol) grubunda $6,618 \pm 0,9941$ mmol/g protein, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $3,261 \pm 0,4990$ mmol/g protein, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $5,486 \pm 0,5371$ mmol/g protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik (fark) saptanmıştır ($p<0,05$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 18 : NO Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 14 : Nitrik Oksit (NO) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
NO (mmol/g protein)	Sham	8	6,618	2,8117	,9941
	I/R	8	3,261	1,4113	,4990
	I/R + Mino	8	5,486	1,5192	,5371
	Total	24	5,122	2,3967	,4892

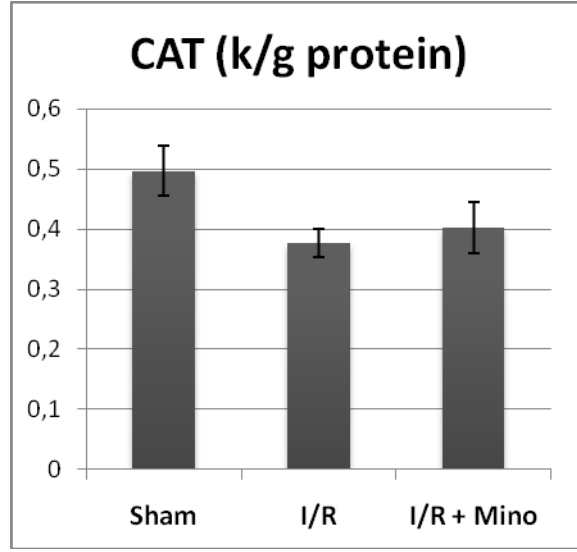
4.2.5. Katalaz (CAT) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında CAT değerleri sham (kontrol) grubunda $0,4967 \pm 0,04099$ k/g protein, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $0,3764 \pm 0,02293$ k/g protein, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $0,4021 \pm 0,04347$ k/g protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 19: CAT Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 15 : Katalaz (CAT) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
CAT (k/g protein)	Sham	8	,4967	,11592	,04099
	I/R	8	,3764	,06486	,02293
	I/R + Mino	8	,4021	,12295	,04347
	Total	24	,4251	,11299	,02306

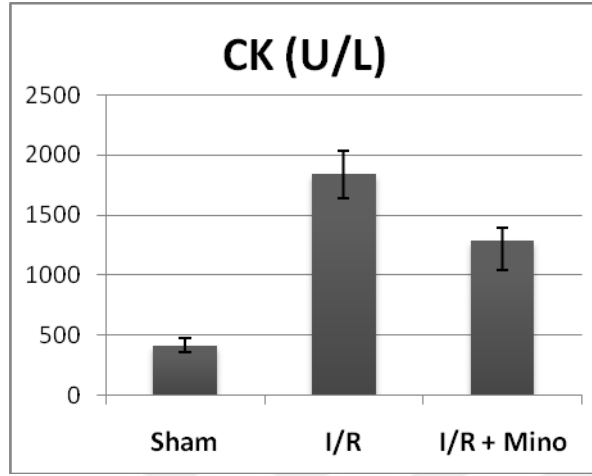
4.2.6. Kreatin Kinaz (CK) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında CK değerleri sham (kontrol) grubunda $412,75 \pm 54,041$ U/L, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $1837,88 \pm 196,684$ U/L, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $1287,88 \pm 250,501$ U/L olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik (fark) saptanmıştır ($p < 0,001$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yükseklik (fark) saptanmıştır ($p < 0,05$).

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 20: CK Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 16 : Kreatin Kinaz (CK) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
CK (U/L)	Sham	8	412,75	152,851	54,041
	I/R	8	1837,88	556,307	196,684
	I/R + Mino	8	1287,88	708,524	250,501
	Total	24	1179,50	783,215	159,873

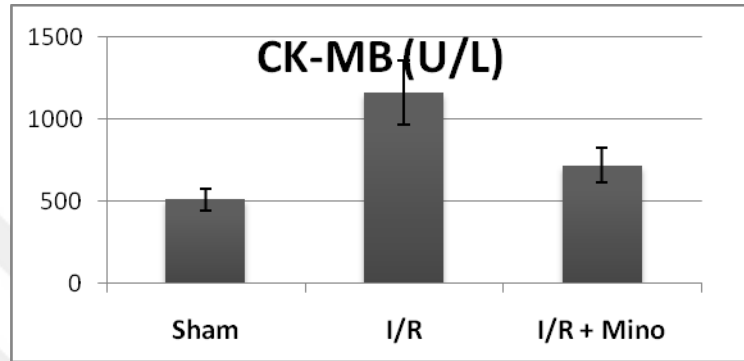
4.2.7. Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında CK-MB değerleri sham (kontrol) grubunda $510,63 \pm 67,485$ U/L, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $1164,63 \pm 195,683$ U/L, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $717,75 \pm 103,135$ U/L olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik (fark) saptanmıştır ($p<0,05$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 21: CK-MB Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 17: Kreatin Kinaz-MB (CK-MB) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
CK-MB (U/L)	Sham	8	510,63	190,876	67,485
	I/R	8	1164,63	553,476	195,683
	I/R + Mino	8	717,75	291,710	103,135
	Total	24	797,67	456,001	93,081

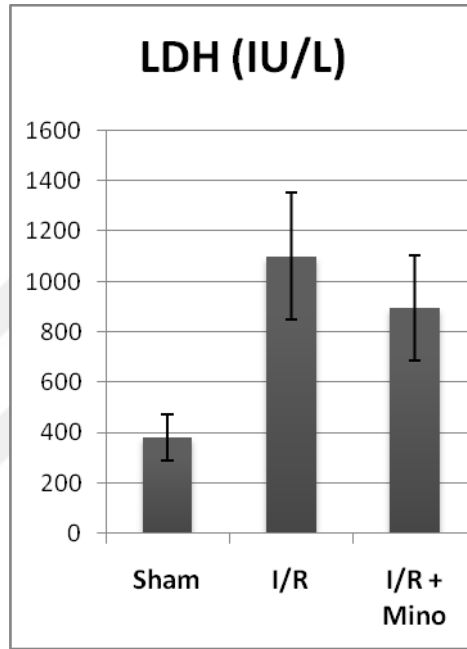
4.2.8. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında LDH değerleri sham (kontrol) grubunda $381,88 \pm 93,045$ IU/L, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $1101,25 \pm 250,930$ IU/L, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $896,50 \pm 208,855$ IU/L olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 22: LDH Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 18 : Laktat Dehidrogenaz (LDH) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
LDH (IU/L)	Sham	8	381,88	263,172	93,045
	I/R	8	1101,25	709,737	250,930
	I/R + Mino	8	896,50	590,731	208,855
	Total	24	793,21	613,319	125,193

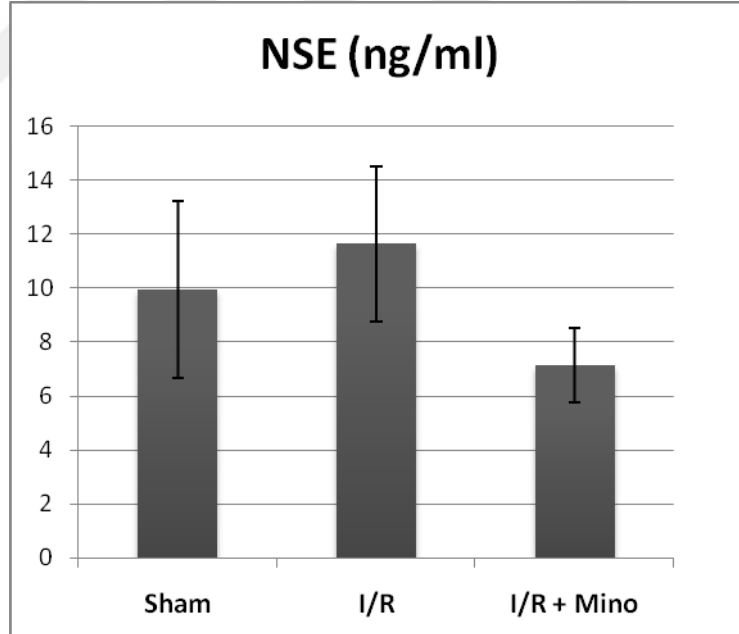
4.2.9. Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Enziminin Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında NSE değerleri sham (kontrol) grubunda $9,949 \pm 3,2756$ ng/ml, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $11,645 \pm 2,8743$ ng/ml, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $7,119 \pm 1,3734$ ng/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 23: NSE Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 19 : Nöron Spesifik Enolaz (NSE) Grubunun One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
NSE (ng/ml)	Sham	8	9,949	9,2649	3,2756
	I/R	8	11,645	8,1297	2,8743
	I/R + Mino	8	7,119	3,8845	1,3734
	Total	24	9,571	7,3804	1,5065

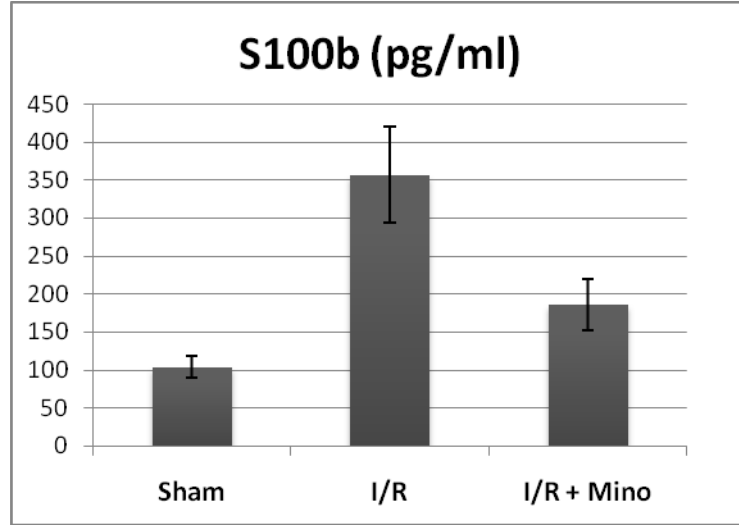
4.2.10 Protein S100B (S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein B) Değerleri

Dekapitasyon sonrası elde edilen serebral doku homojenatında Protein S100B değerleri sham (kontrol) grubunda $103,880 \pm 14,7860$ pg/ml, iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunda $356,920 \pm 63,2405$ pg/ml, iskemi-reperfüzyon + minosiklin uygulanan (I/R+Mino) grupta $185,928 \pm 33,5672$ pg/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar One-Way Anova2 testi ile değerlendirildi.

Sonuç olarak I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$).

I/R+Mino grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$).

I/R+Mino grubu I/R grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 24: S100b Değerlerinin Şematik Analizi

Tablo 20 : Protein S100B (Kalsiyum Bağlayıcı Protein B) Grubu One-Way Anova2 Değerleri

		N	Mean	S. D.	S.E.
S100b (pg/ml)	Sham	8	103,880	41,8212	14,7860
	I/R	8	356,920	178,8710	63,2405
	I/R + Mino	8	185,928	94,9424	33,5672
	Total	24	215,576	156,8675	32,0204

5.TARTIŞMA

Serebral iskemi ve reperfüzyona bağı gelişen beyin hasarı ve hasarın tanısı, prognozu, tedavisi günümüzde sinirbilim ile ilgili disiplinlerin başlıca ilgi alanlarındandır.

İskemi-reperfüzyon sonrası gelişen serebral doku hasarının azaltılmasına yönelik olarak multidisipliner ve çok merkezli birçok çalışma ile olası tedavi edici moleküller ve bu moleküllerle oluşturulabilecek optimal tedavi protokolleri araştırılmış ve hala da araştırılmaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarının sinirbilim ile ilgili bilim insanlarınca bu kadar irdelenmesinin başlıca nedenleri arasında altta yatan nedenler farklı olabilmesine rağmen iskeminin sık gözlenen bir tablo olmasıdır. Beyin damar hastalıklarının %85'inin iskemiye bağı gelişen tablolar tarafından oluşturulması; iskemik stroke'nun batı dünyasında kimi yazarlara göre üçüncü kimi yazarlara göre de ikinci sıklıkta ölüm nedeni ve en sık morbiditeye yol açan hastalık grubu olması yönündeki literatür bilgileri bu ilgiyi açıklar ve destekler niteliktedir (3, 22-24, 119).

Serebral iskemi beyin kan akımında azalma veya kesilme, buna bağı olarak enerji kaynaklarının tükenmesi, nöronal dejenerasyon ve ölümle sonlanan bir kaskaddır (1, 2).

İskemi etyolojisi ile ilgili olarak fokal veya global iskemi şekilde gözlenebilmektedir. Global serebral iskemide serebral kan akımı gözlenememesine karşın fokal serebral iskemide kollateral dolanımlar sayesinde düşük düzeylerde kan akımı potansiyeli mevcuttur. Fokal serebral iskemideki rezidüel perfüzyon hücre

membranlarındaki devamlılığı sağlarken düşük düzeye metabolik aktivitenin de devam ettirilmesine de yardımcı olur (5). Fokal serebral iskemideki lezyon santral fokus ve perifokal alan olarak adlandırılan iki bölgeden oluşmaktadır. Santral fokus reperfüzyonun hızla yapılmadığı durumlarda oluşan infarkt alanıdır. Santral fokus lezyonun en yoğun olduğu bölgedir, dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasar olur. Perifokal alan elektiriksel aktivite açısından sessiz, iyon pompaları halen intakt olan bölgedir. Perifokal alan reperfüzyonun yeniden sağlanması, nöroprotektif ajanlarla desteklenmesi durumunda kurtarılabilmek olası olduğu alanıdır (6).

Serebral iskemi-reperfüzyon hasarında temel, iskemiye bağlı ortaya çıkan nöronal hasara ek olarak reperfüzyon sırası ve sonrasında açığa çıkan kimyasal mediatör ve maddelerdir. Bu mediatör ve maddelerin açığa çıkmasında hücre içi enerji rezervinin azalması veya bitmesi ile birlikte oksijen desteğinin yetersizleşmesinin rol oynadığı düşünülmektedir. Fizyolojik şartlarda beyin dokusunun enerji gereksinimi aerobik glikoliz ve ürünü olan ATP ile sağlanmaktadır. İskemiye bağlı oksijen yokluğunda mitokondrilerdeki elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon bozulur ve ATP sentezi durur. ATP sentezinin durmasına bağlı asidoz, makromolekül sentezinde kesinti, iyon dengesizliği, ATP yıkım ürünlerinin birikimi gerçekleşir. İskemik hasarın başlangıcında kısa bir süre anaerobik glikoliz gerçekleşir, 2-3 dakika sonra beyin dokusundaki laktat düzeyi maksimuma çıkar. Anaerobik mekanizma ile oluşan laktik asit ve düşük pH'a bağlı protein denatürasyonu, enzimatik moleküllerde fonksiyonel kayıp, ödem, serbest radikal oluşumu gerçekleşir (93).

Biyokimyasal süreçlere ek olarak immün hücreler arasında izlenen etkileşimlere bağlı gelişen immünolojik olayların da iskemi fizyopatogenezinde rol almaktadır. Bu döngüdeki başlıca aktörler arasında eksitotoksisite, nitrik oksit etkileri, iyon değişiklikleri, serbest radikaller, iskemi sonrası inflamatuvar reaksiyonlar yer almaktadır (8).

Serbest radikaller lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranlarına doğrudan hasar veren, potent okside edici ve indirgeyici ajanlardır (9). Serbest radikaller normal hücre döngüsü içinde mitokondrilerde üretilen ve antioksidan

mekanizmalarla etkileri nötrleştirilen moleküllerdir. Ancak iskemi-reperfüzyon hasarı ve buna benzer travmalarda hücrenin fizyolojik mekanizmalarındaki bozulmaya bağlı olarak antioksidan mekanizmalar gerektiği gibi çalışmamakta, serbest radikallerin direkt zararlı etkileri engelenememekte, miktarı artan bu serbest radikaller de hücre içi yapılarla girdiği etkileşimler sonucunda lipid peroksidasyonuna yol açmakta, serbest radikal miktarını daha da arttıracak bir kısır döngü meydana gelmektedir.

Serbest radikallerle oluşturulan oksidatif hasara karşı korunmada SOD, CAT, GSH-Px gibi endojen antioksidanlar önemli rol oynamaktadır (11). MDA gibi lipid peroksidasyon biyoürünlerinin oluşumu, endojen antioksidan moleküllerin tüketim hızlarının oranı iskemiye bağlı hasarlanan nöral dokunun gösterilmesinde önemli rol oynamaktadır (10).

Histopatolojik olarak nötrofiller direkt migrasyonla reperfüze olan dokuda birikirler. Aktive olan nötrofillerin salgıladığı elastaz, jelatinaz, kollajenaz gibi enzimler endotel hücrelerinin devamlılığını bozarlar. İskemi-reperfüzyon hasarında bu etki ile vasküler endotel bütünlüğünün bozulması kilit roldedir. Endotel bütünlüğü bozulunca ortaya çıkan sitotoksik ajanların etkisi ile mikrovasküler geçirgenlik artar, interstisyel alana sıvı kaçışı, ödem, hemokonsantrasyon meydana gelir. Bu mekanizmaya bağlı olarak kapiller lümen daralır ve perfüzyon bozulur (104, 105). Nötrofil-endotel adezyonu zedelenme etkeni olan ajanların yüksek konsantrasyona ulaşmasını tetikleyen mikro ortam oluşumuna katkıda bulunur (104). Bu adezyon mekanizmalarının önemi hayvan deneylerinde nötrofil adeziv glikoproteinler üzerinde (CD11, CD18, integrinler) gösterilmiştir. Adezyon nedeni ile serbest radikallerin, proteazların ortama salınması ile oluşan hasar tetiklenir. Nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınan ve indirekt nötrofil birikimine işaret eden miyeloperoksidaz aktivitesi ölçülerek dokuda nötrofil birikimi değerlendirilebilmektedir (104, 106).

İskemik nöronal değişikliklerin birinci evresinde perikaryumda mikrovakuolizasyon gözlenir. Bu evrede nükleus normal veya hafif küçülmüş, nükleolus normal görünümündedir ve hücre büyüklüğünde belirgin farklılık gözlenmez. İkinci evrede hücre şişer, stoplazmada koyu boyanan protein içeriğinde artış ve

nükleusun üçgen şeklini alıp küçülerek kenara itilmesi gözlenir. Üçüncü evrede hücre gövdesinde boşluklar oluşur, membran hasarı meydana gelmiştir. Dördüncü evrede nöronlar homojen görünüme bürünürler ve parçalanırlar. Bu evreden sonra artık materyaller fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılırlar (107).

Bizim araştırmalarımızda saptayabildiğimiz kadarı ile iskemik beyin hasarı ile ilgili dizayn edilmiş pek çok histopatolojik çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda ışık mikroskobu görüntülemelerinde kontrol grubunda normal histomorfolojik yapı gözlenmiş olup, iskemi-reperfüzyon grubunda belirgin konjesyon, vakuolizasyon ve eozinofilik dejenerasyon yönünde değişiklikler olduğu saptanmıştır. İskemi-reperfüzyon + minosiklin grubunun görüntülemelerinde ise dejenerasyon bulgularında kısmi düzelme saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda vakuolizasyon, konjesyon ve eozinofilik dejenerasyon yönünden tüm gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur.

Kavaklı ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ratlarda beyin iskemi-reperfüzyonu sonucu oluşan morfolojik değişikliklere melatonin ve pinealektominin etkileri incelenmiş ve bizim çalışmamızla benzer şekilde vakuolizasyon, eozinofilik dejenerasyon (red nöron) ve konjesyon gözlenmiştir. Farklı olarak Kavaklı ve ark. tarafından ödem ve infarkt alanları da gözlenmiş ve melatoninin histopatolojik olarak bulguları azattığı bildirilmiştir (147).

Uzar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada deneysel serebral iskemi/reperfüzyon hasarında kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkisi incelenmiş ve bizim çalışmamızla benzer şekilde konjesyon gözlenmiştir. Farklı olarak inflamasyon, nekrobiyoz ve nekroz bulguları gözlenmiş ve verilen molekülün histopatolojik olarak beyin hasarı bulgularını azalttığı bildirilmiştir (148).

İskemik reperfüzyon hasarında meydana gelen serbest oksijen radikalleri oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Oluşan bu serbest oksijen radikallerinden özellikle süperoksit radikali stabil değildir. Hücre içindeki mekanizmalarla ROS'e (reactive oxygen species) dönüşen süperoksit radikalleri poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu meydana getirir. İskemik-reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeyleri artar. Bizim

çalışmamızda da iskemi-reperfüzyon (I/R) grubunun MDA düzeyleri Irmak ve ark. nin çalışmalarındaki bilgiler ile uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır ($p<0,001$) (149). Çalışmamızda araştırdığımız etken madde olan minosiklinin verildiği iskemi-reperfüzyon+minosiklin (I/R+Mino) grubunun MDA değerleri I/R grubuna göre anlamlı düşüş ($p<0,001$) göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda biz iskemi-reperfüzyon hasarında MDA düzeylerinin kontrol ve takip açısından önemli bir parametre olduğunu ve minosiklinin ekzojen olarak oksidatif stresi azaltıcı ajan gibi davranarak koruyucu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Hosseinzadeh ve ark. tarafından safranal adlı safran derivativinin rat hipokampusunda serebral iskemi ile meydana getirilen oksidatif stres üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada da bizim çalışmamızla uyumlu olarak iskemi reperfüzyon hasarı ile MDA düzeylerinin arttığı ve safranal ile bu değerlerin anlamlı derecede düştüğü raporlanmıştır (150).

İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak meydana gelen serbest oksijen radikallerine etki eden antioksidan maddeler endojen ve ekzojen olarak iki ana gruba ayrılabilir. Endojen antioksidan maddelerin en önemlileri arasında SOD, CAT, GSH-Px gelmektedir. SOD, süperoksit radikalinden hidrojen peroksit meydana gelmesini sağlamaktadır. Hidrojen peroksitten de CAT ve GSH-Px aracılığı ile su molekülleri açığa çıkmakta bu sayede süperoksit radikallerinin zararlı etkileri ortadan kaldırılabilir. Bizim çalışmamızda hem CAT hem de GSH-Px'in I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) azalma saptanmış olup I/R+Mino grubunda I/R grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Beyin endojen antioksidanlarından CAT ve GSH-Px aktivitesinin azalması ortamda hidrojen peroksid artışına neden olabilir.

Artan hidrojen peroksid, hidroksil radikale dönüşebilir. Hidroksil radikal miktarının yüksekliği MDA düzeylerindeki artışa yol açmış olabilir. Çalışmamızda SOD değerlerinde sham ile I/R ve I/R+Mino grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. I/R hasarındaki anti oksidan mekanizmalar GSH-Px ve CAT üzerinden gerçekleşmiştir. Artan oksidatif strese cevapta SOD'un aktif rol oynadığını göstermektedir.

NO endotel kökenli güçlü bir vazodilatatördür. NO'nun sentezlendikten sonra serbestlenmesi ve miktarı, metabolitleri olan nitrit ve nitratlar üzerinden değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak NO düzeylerinde I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu ($p<0,05$) gözlenmiştir. I/R+Mino grubunda ise I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) yükselme olduğu gözlenmiştir. Minosiklin verilen grupta I/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükselmenin NO'nun sitotoksik etkisinin baskılanmış ve NO'un reaktif vazodilatatör etkileri ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü, iskemi reperfüzyon esnasında azalan kan akımını dengelemek ve serebral perfüzyona katkıda bulunmak amacı ile NO seviyelerinde artış meydana gelebilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda minosiklin sayesinde vasoprotektif etkiyle NO sentezinde artış olabileceği; buna bağlı perfüzyon ve potent anti-inflamatuvar etkinin sağlanmaya çalışıldığı düşünülebilir, ancak nöronal hasarın bu durumda artacağı da unutulmamalıdır (13, 14, 151).

Çalışmamızda NO düzeyleri literatürle farklılık arz etmektedir. NO düzeylerindeki değişiklikler kullandığımız çalışma protokolü ve ilaç uygulama protokollerindeki farklılıklara bağlı etkilenen endotel hücre aktivasyonuna sekonder olmuş olabilir.

Altaş ve ark. tarafından seftriaksonun rat beyindeki iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada I/R grubunda MDA düzeylerinde çalışmamızı destekler nitelikte anlamlı artış raporlanmıştır. Aynı çalışmada gruplar arasında NO değerlerinde anlamlı fark raporlanmamış olup bizim çalışmamızdan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Altaş ve ark. çalışmasında I/R grubunda SOD seviyelerinde anlamlı azalma raporlanmış olup bizim çalışmamızda gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Aynı çalışmada GSH-Px düzeyleri incelendiğinde I/R grubunda anlamlı azalma belirtilmiştir, bu bulgu bizim çalışmamızla uyumludur (152).

CK özellikle kas metabolizmasında yer alan temel enzimler arasındadır. Dimerik yapıda olan CK, B ve M zincirlerinden oluşmakta olup CK-MB, CK-BB, CK-MM şeklinde üç al tipi vardır. BB alt tipi özellikle beyin ve böbrek dokusunda bulunmaktadır ve nöronal hasarda kan ve BOS'da düzeyleri artar (153). CK-BB

düzeyleri travma, iskemi gibi patolojilerde artmasına rağmen ölçüm açısından çok düşük olduğundan uygun standardizasyon ve hesaplamalarla CK-MB düzeyleri CK-BB düzeyleri ile ilgili bilgi vermek üzere kullanılabilir. Çalışmamızda CK düzeyleri I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) artmıştır. I/R+Mino grubunda, I/R grubuna göre istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) azalma gözlenmektedir. CK-MB düzeyleri değerlendirildiğinde ise I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) artış; I/R+Mino grubunda I/R grubuna göre istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) azalma gözlenmektedir. Çalışmamızda minosiklin verilen grupta, I/R grubuna göre CK ve CK-MB değerlerindeki düşüşün minosiklinin protektif etkilerini destekler nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

Sitozolik bir glikoliz enzimi olan LDH'nin hücre hasarında plazmaya geçmekte ve buna bağlı olarak aktivitesi artmış olarak saptanmaktadır. Çalışmamızda LDH düzeylerinde I/R grubunda sham grubuna göre istatistiksel anlamlı ($p<0,05$) artış gözlenmektedir. I/R+Mino grubunda, I/R grubuna göre istatistiksel anlamlı azalma gözlenmemektedir.

NSE glikolitik yollarda kullanılan, moleküler ağırlığı yaklaşık 80.000 D olan, çözünebilir dimerik bir enzimdir. Spesifik olarak nöronal stoplazmada ve dendritlerde, APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) hücre sisteminde bulunan bir moleküldür. NSE doğal olarak bulunduğu bu yapılar dışında bazı malignansilerde de serumda artmış düzeyde gözlenebilir. Literatürde strok ve kardiyak arrest gibi patolojilerde artmış serum düzeyleri gösterilmiştir (154). Çalışmamızda I/R ve I/R+Mino gruplarının değerlerinde sham grubuna göre sayısal olarak artış gözlenmekle beraber istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.

Horn ve ark. tarafından gerbil beyin ve serumunda geçici serebral iskemi sonrasında nöron spesifik enolaz düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmada oklüzyon sonrası NSE seviyeleri oklüzyon süresinin uzunluğuna göre farklı olmak üzere belirgin yükselişini post-iskemik 4. saat veya 24. saatte göstermiş ve maksimum değerler kontrol gruplarının 3 katı ile 20 katı arasında değişmiş olarak bulunmuş. Ayrıca her iki grup da iskemik yaralanma sonrası NSE yüksekliğini 96 saate kadar sürdürmüş olarak raporlanmış. Aynı çalışmada NSE'nin iskemi sonrası nöronal immunoreaktivite kaybının artmış NSE düzeyleri ile ilintili olduğu belirtilmiş (154).

Kittaka ve ark. tarafından ratlarda fokal iskemi ve reperfüzyon sonrası beyin hasarısı ve NSE azalmasına sistemik dolaşımdaki nikardipinin etkileri ile ilgili yapılan çalışmada da belirtildiği gibi NSE nöron hasarı ile ilgili olarak plazmada spesifik olarak ölçülebilen bir markerdir (155).

Bizim tarayabildiğimiz kadarı ile literatürde NSE değerlerinin serebral iskemi tanısının konması açısından biyokimyasal bir parametre olabileceği ve değerlerinde uygun tedavi ile düşme saptanabildiğinden hastalığın genel prognozunu gösterebileceği ile ilgili bilgiler bulunmaktadır. Çalışmamızda iskemi sonrası 20 dakikalık perfüzyonun ardından dekapitasyon hemen uygulandığından, denekler uzun süre reperfüzyona maruz kalmamışlardır. Çalışmamızdaki NSE değerlerinin bu nedenle literatürdeki gibi anlamlı yüksek değerlere sahip olmadığını düşünmekteyiz. Bu bilgiler doğrultusunda NSE'nin serebral iskemide diyagnostik ve prognostik yerinin çok merkezli ve geniş çalışmalarla detaylı olarak incelenmesi ve standardize edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Nöronal protein S100b hücrel beyin hasarını gösteren bir parametredir ve plazma değerleri serebral travma sonrası artmaktadır. Protein S100b astrosit marker proteinlerdendir. Periferdeki S100b ekspresyonu iskemi sonrası reperfüzyon hasarı ile artış göstermektedir ve bu bilgi S100b sentezinin up-regüle edildiğinin işaretidir.

Yasuda ve ark.larının çalışmasında ekstraselüler aralıktaki S100b yüksekliğinin hasarlanmış astrositlerin S100b sentezini up-regüle etmesi ile ilgili olabileceği ifade edilmektedir (156).

Çalışmamızda I/R ve I/R+Mino gruplarında sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptanmakla beraber I/R+Mino grubunda I/R grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmamızdaki protein S100b değerlerinde iskemi sonrası saptanan yükselme literatürle uyumludur. Minosiklin uygulanan grupta I/R grubuna göre anlamlı fark saptanmaması uygulanması gereken optimum ilaç dozu, süresi ile ilgili olabileceği gibi iskemi sonrası reperfüzyon hasarının belirlenebilmesi için daha uzun süre beklenmesi gerekliliği olabilir.

Bu çalışmada serebral iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan ratların bir grubuna minosiklin verildi. Grupların patolojik ve biyokimyasal değerlendirmeleri

yapıldı. Minosikline baēlı iskemi-reperfüzyon hasarındaki bazı parametrelerde istatistiksel anlamlı deēiřiklikler saptandı ve patolojik deēerlendirmelerde kısmi düzelme gözlemlendi. Minosiklinin nöroprotektif ve antioksidan etkinliēi olabileceēi ile çalışmalar mevcuttur ancak biz literatürde saptayabildiēimiz kadarı ile minosiklinle yapılmış çalışmalarda NSE, protein S100 B, CK ve CK-MB parametrelerinin çok irdelenmediēini gözlemledik. Ayrıca minosiklin ile ratlarda yapılmış çalışmalarda minosiklinin veriliş doz, zaman (iskemi öncesi, sonrası), sıklıēı ve veriliş süresi ile ilgili çok farklı deēerlendirmeler olduēu gözlemlendi. Çalışmamızdaki deēerlerimiz ve sonuçlar bize tanı, prognoz ve tedavide optimum faydalı olabilecek laboratuvar testlerinin ve minosiklinin etkilerinin çok merkezli ve geniş denek sayılı çalışmalarda irdelenmesi gerektiēini düşündürdü.

6.SONUÇLAR

“Sıçanlarda Minosiklinin Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma ikinci kuşak yarı sentetik bir tetrasiklin olan minosiklinin anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve nöroprotektif etkilerini nöral doku için anlamlı olabilecek biyokimyasal parametrelerle ve histopatolojik değerlendirmelerle incelemek üzere yapılmıştır.

Bilateral CCA oklüzyonu sonrası yapılan reperfüzyon ile serebral dokuda reperfüzyon hasarı oluşturulmaya çalışılmış ve bu hasar MDA, SOD, NO, CAT, GSH-Px, CK, CK-MB, LDH, NSE ve protein S100bden oluşan biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Biyokimyasal parametrelere ek olarak histopatolojik görüntüleme yapılmış, uygulanan modifiye skala sistemiyle değerlendirilmiştir. Biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler SPSS paket programı (SPSS v15 for Windows) kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve verilerin dağılımına göre One-Way ANOVA testi, gruplar arası karşılaştırmalarda post-hoc LSD testi uygulanmıştır.

Serebral iskemi sonrası reperfüzyonla oluşan hasarda minosiklinin nöroprotektif, anti-inflamatuvar, anti-oksidan etkiler gösterdiği, bunun nöronal yapıda kısmi düzelmeye neden olduğu düşünülebilir. Bu kanıyı destekler nitelikte bulgular elde edildiği de düşünülmektedir. İskemi sonrası reperfüzyon süresinin uzun tutulmasının, buna bağlı incelenen biyokimyasal markırların reperfüzyon başladıktan sonra belli aralıklarla ve uzun bir süreç boyunca değerlendirilmesinin daha detaylı sonuçlar elde edilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Minosiklinin serebral iskemi-reperfüzyon hasarında etkinliğinin araştırılması ile ilgili çalışmalarda NSE, protein S100b gibi markırların incelenmesinde elde edilebilecek destekleyici sonuçlarla minosiklinin ilerleyen zamanlarda tedavi edici ve prognostik açıdan rutin kullanıma girmesi gerçekleşebilir, morbidite ve mortaliteye olumlu katkılar sağlanabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** 1999 Sep;22(9):391-7.
2. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. **J Neurosurg.** 1992 Aug;77(2):169-84.
3. Easton JD. Current advances in the management of stroke. **Neurology.** 1998 Sep;51(3 Suppl 3):S1-2.
4. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. **Stroke.** 1984 Jan-Feb;15(1):5-14.
5. 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.
6. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. **Cell Mol Neurobiol.** 1998 Dec;18(6):621-38.
7. Macdonald RL. History and definition of delayed cerebral ischemia. **Acta Neurochir Suppl.** 2013;115:3-7.
8. Bielewicz J, Kurzepa J, Lagowska-Lenard M, Bartosik-Psujek H. [The novel views on the pathomechanism of ischemic stroke]. **Wiad Lek.** 2010;63(3):213-20.
9. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. **Pathol Int.** 1999 Feb;49(2):91-102.
10. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. **Stroke.** 1990 Jul;21(7):1086-90.
11. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2002 Jun;26(5):995-1005.

12. Yilmaz I, Adiguzel E, Akdogan I, Kaya E, Hatip-Al-Khatib I. Effects of second generation tetracyclines on penicillin-epilepsy-induced hippocampal neuronal loss and motor incoordination in rats. **Life Sci.** **2006** Jul 17;79(8):784-90.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** **1976** May 7;72:248-54.
14. Burchill BR, Oliver JM, Pearson CB, Leinbach ED, Berlin RD. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. **J Cell Biol.** **1978** Feb;76(2):439-47.
15. Sadler TW, Langman J. Langman's medical embriology 9 Ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
16. Donkelaar HJT, Lammens M, Hori A. Clinical Neuroembryology: Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Company KG; 2006.
17. Greenberg MS, Nicolas Arredondo MD. Handbook of neurosurgery: Greenberg Graphics; 2006.
18. Moore KL. Clinically oriented anatomy: Williams & Wilkins; 1992.
19. Yasargil MG. Microneurosurgery: Microsurgical Anatomy of the Basal Cisterns and Vessels of the Brain, Diagnostic Studies, General Operative Techniques and Pathological Considerations of the Intracranial Aneurysms: Thieme Medical Publishers, Incorporated; 1984.
20. Paxinos G. The Rat Nervous System: Elsevier Science; 2004.
21. Aksoy K, Palaoğlu S, Pamir N, Tuncer R. Temel nöroşirürji: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları; 2005.
22. Alberts MJ. Diagnosis and treatment of ischemic stroke. **Am J Med.** **1999** Feb;106(2):211-21.
23. Atkinson RP, DeLemos C. Acute ischemic stroke management. **Thromb Res.** **2000** May 1;98(3):97-111.
24. Hoggard N, Wilkinson ID, Griffiths PD. The imaging of ischaemic stroke. **Clin Radiol.** **2001** Mar;56(3):171-83.
25. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of neurology: McGraw-Hill, Health Professions Division; 1997.
26. Özdemir G, Özkan S, Uzuner N, Özdemir Ö, Gücüyener D. Türkiye'de beyin damar hastalıkları için majör risk faktörleri: Türk çok merkezli stroke çalışması. **Türk BDH Dergisi.** **2000**;6:31-5.
27. Balkan S. Serebrovasküler hastalıklar: Güneş Kitabevi; 2002.

28. Bonita R, Stewart A, Beaglehole R. International trends in stroke mortality: 1970-1985. **Stroke**. **1990** Jul;21(7):989-92.
29. Malmgren R, Warlow C, Bamford J, Sandercock P. Geographical and secular trends in stroke incidence. **Lancet**. **1987** Nov 21;2(8569):1196-200.
30. Wilkins RH, Rengachary SS. Neurosurgery. Vol. 2: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 1985.
31. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.
32. McCullough LD, Beauchamp NB, Wityk R. Recent advances in the diagnosis and treatment of stroke. **Surv Ophthalmol**. **2001** Jan-Feb;45(4):317-30.
33. Adams F, Society S. The Genuine Works of Hippocrates: Sydenham Society; 1849.
34. Donley JE. John James Wepfer, a Renaissance Student of Apoplexy 1909.
35. Newton TH, Potts DG. Angiography: Mosby; 1974.
36. Magladery JW. The natural course of cerebrovascular hemorrhage. **Clin Neurosurg**. **1963**;9:106-13.
37. Mizukami M. Hypertensive Intracerebral Hemorrhage: Raven Press; 1983.
38. Macewen W. An Address on the Surgery of the Brain and Spinal Cord. **Br Med J**. **1888** Aug 11;2(1441):302-9.
39. Cushing H. The Blood-pressure Reaction of Acute Cerebral Compression, Illustrated by Cases of Intracranial Hemorrhage : a Sequel to the Mutter Lecture for 1901 1903.
40. Winn HR, Youmans JR, Fund BWG. Youmans Neurological Surgery: W.B. Saunders; 2004.
41. Penfield W. The Operative Treatment of Spontaneous Intracerebral Haemorrhage. **Can Med Assoc J**. **1933** Apr;28(4):369-72.
42. Carter LP, Spetzler RF, Hamilton MG. Neurovascular surgery: McGraw-Hill, Incorporated, Health Professions Divisions; 1995.
43. Niizuma H, Shimizu Y, Yonemitsu T, Nakasato N, Suzuki J. Results of stereotactic aspiration in 175 cases of putaminal hemorrhage. **Neurosurgery**. **1989** Jun;24(6):814-9.
44. Toole JF, Barnett HJM, Patel AN. Cerebrovascular disorders: Raven Press; 1984.
45. Welch KMA. Primer on cerebrovascular diseases: Academic Press, Incorporated; 1997.
46. Ayres SM, Grenvik A, Shoemaker WC, Holbrook PR. Textbook of critical care: Saunders; 1995.

47. Lassen NA. Brain extracellular pH: the main factor controlling cerebral blood flow. **Scand J Clin Lab Invest.** **1968** Dec;22(4):247-51.
48. Dearden NM. Ischaemic brain. **Lancet.** **1985** Aug 3;2(8449):255-9.
49. Hertz L. Features of astrocytic function apparently involved in the response of central nervous tissue to ischemia-hypoxia. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1981**;1(2):143-53.
50. Youmans JR. Neurological surgery: a comprehensive reference guide to the diagnosis and management of neurosurgical problems: Saunders; 1982.
51. Keçik Y, Ünal N. Nöroanestezi: Anestiyoloji ve reanimasyon uzmanları derneği (ARUD); 2000.
52. Diaz FG, Ausman JJ. Experimental cerebral ischemia. **Neurosurgery.** **1980** Apr;6(4):436-45.
53. Wilkins RH, Rengachary SS. Neurosurgery: McGraw-Hill; 1996.
54. Kontos HA, Wei EP, Raper AJ, Rosenblum WI, Navari RM, Patterson JL, Jr. Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation. **Am J Physiol.** **1978** May;234(5):H582-91.
55. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. **Cerebrovasc Brain Metab Rev.** **1990** Summer;2(2):161-92.
56. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1994** Mar;14(2):175-92.
57. Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. **Blood Vessels.** **1990**;27(2-5):246-57.
58. Lowe RF, Gilboe DD. Demonstration of alpha and beta adrenergic receptors in canine cerebral vasculature. **Stroke.** **1971** Mar-Apr;2(2):193-200.
59. Rosenblum WI. Neurogenic control of cerebral circulation. **Stroke.** **1971** Sep-Oct;2(5):429-39.
60. Skinhoj E. The sympathetic nervous system and the regulation of cerebral blood flow in man. **Stroke.** **1972** Nov-Dec;3(6):711-6.
61. Aoyagi M, Meyer JS, Deshmukh VD, Ott EO, Tagashira Y, Kawamura Y, et al. Central cholinergic control of cerebral blood flow in the baboon. Effect of cholinesterase inhibition with neostigmine on autoregulation and CO₂ responsiveness. **J Neurosurg.** **1975** Dec;43(6):689-705.
62. Skinhoj E. The sympathetic nervous system and the regulation of cerebral blood flow. **Eur Neurol.** **1971**;6(1):190-2.

63. Kawamura Y, Meyer JS, Hiromoto H, Aoyagi M, Tagashira Y, Ott EO. Neurogenic control of cerebral blood flow in the baboon. **J Neurosurg.** **1975** Dec;43(6):676-88.
64. Langfitt TW. Cerebral circulation & metabolism: Springer-Verlag; 1975.
65. Stone HL, Raichle ME, Hernandez M. The effect of sympathetic denervation on cerebral CO₂ sensitivity. **Stroke.** **1974** Jan-Feb;5(1):13-8.
66. Hasegawa T, Ravens JR, Toole JF. Precapillary arteriovenous anastomoses. "Thoroughfare channels" in the brain. **Arch Neurol.** **1967** Feb;16(2):217-24.
67. Gotoh F, Tazaki Y, Meyer JS. Transport of gases through brain and their extravascular vasomotor action. **Exp Neurol.** **1961** Jul;4:48-58.
68. Koehler RC, Traystman RJ. Bicarbonate ion modulation of cerebral blood flow during hypoxia and hypercapnia. **Am J Physiol.** **1982** Jul;243(1):H33-40.
69. Phillis JW. The Regulation of Cerebral Blood Flow: CRC Press; 1993.
70. Golanov EV, Reis DJ. Contribution of oxygen-sensitive neurons of the rostral ventrolateral medulla to hypoxic cerebral vasodilatation in the rat. **J Physiol.** **1996** Aug 15;495 (Pt 1):201-16.
71. Dreier JP, Korner K, Gorner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, et al. Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1995** Nov;15(6):914-9.
72. Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? **Science.** **1987** Aug 21;237(4817):896-8.
73. Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1993** Mar;13(2):276-84.
74. Patel TR, Galbraith S, Graham DI, Hallak H, Doherty AM, McCulloch J. Endothelin receptor antagonist increases cerebral perfusion and reduces ischaemic damage in feline focal cerebral ischaemia. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1996** Sep;16(5):950-8.
75. Roux S, Loffler BM, Gray GA, Sprecher U, Clozel M, Clozel JP. The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm. **Neurosurgery.** **1995** Jul;37(1):78-85; discussion -6.
76. Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW. Permissive role of prostanoids in acetylcholine-induced cerebral vasoconstriction. **J Pharmacol Exp Ther.** **1989** Dec;251(3):1012-9.
77. Busija DW, Heistad DD. Effects of indomethacin on cerebral blood flow during hypercapnia in cats. **Am J Physiol.** **1983** Apr;244(4):H519-24.
78. Busija DW, Leffler CW. Role of prostanoids in cerebrovascular responses during seizures in piglets. **Am J Physiol.** **1989** Jan;256(1 Pt 2):H120-5.

79. Underwood MD, Bakalian MJ, Arango V, Smith RW, Mann JJ. Regulation of cortical blood flow by the dorsal raphe nucleus: topographic organization of cerebrovascular regulatory regions. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1992** Jul;12(4):664-73.
80. Goadsby PJ, Uddman R, Edvinsson L. Cerebral vasodilatation in the cat involves nitric oxide from parasympathetic nerves. **Brain Res.** **1996** Jan 22;707(1):110-8.
81. Kano M, Moskowitz MA, Yokota M. Parasympathetic denervation of rat pial vessels significantly increases infarction volume following middle cerebral artery occlusion. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1991** Jul;11(4):628-37.
82. Edvinsson L, MacKenzie ET, McCulloch J. Cerebral blood flow and metabolism: Raven Press; 1993.
83. Edvinsson L, Uddman R, Juul R. Peptidergic innervation of the cerebral circulation. Role in subarachnoid hemorrhage in man. **Neurosurg Rev.** **1990**;13(4):265-72.
84. McCulloch J, Uddman R, Kingman TA, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **1986** Aug;83(15):5731-5.
85. Wei L, Otsuka T, Acuff V, Bereczki D, Pettigrew K, Patlak C, et al. The velocities of red cell and plasma flows through parenchymal microvessels of rat brain are decreased by pentobarbital. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1993** May;13(3):487-97.
86. Bereczki D, Wei L, Otsuka T, Acuff V, Pettigrew K, Patlak C, et al. Hypoxia increases velocity of blood flow through parenchymal microvascular systems in rat brain. **J Cereb Blood Flow Metab.** **1993** May;13(3):475-86.
87. Pawlik G, Rackl A, Bing RJ. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. **Brain Res.** **1981** Mar 9;208(1):35-58.
88. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. **Stroke.** **2003** Jan;34(1):214-23.
89. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia--reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Prog Brain Res.** **1985**;63:39-58.
90. Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends Neurosci.** **1995** Feb;18(2):58-60.
91. Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology.** **1995** Jan;34(1):1-26.
92. Schurr A. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain (Review). **Int J Mol Med.** **2002** Aug;10(2):131-6.
93. Siesjo BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjo P, et al. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. **J Neurotrauma.** **1995** Oct;12(5):943-56.

94. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM, Jr., Yaksh TL. Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion, electroencephalography, and histology in severe and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. **J Cereb Blood Flow Metab.** 1986 Feb;6(1):71-8.
95. Selman WR, Crumrine RC, Ricci AJ, LaManna JC, Ratcheson RA, Lust WD. Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke.** 1990 Mar;21(3):467-71.
96. Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. **Stroke.** 1993 Jan;24(1):117-21.
97. Schwartz-Bloom RD, Sah R. gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. **J Neurochem.** 2001 Apr;77(2):353-71.
98. Danbolt NC. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.** 2001 Sep;65(1):1-105.
99. Garcia JH, Anderson ML. Physiopathology of cerebral ischemia. **Crit Rev Neurobiol.** 1989;4(4):303-24.
100. Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrova J, Bazan NG, Siesjo BK. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. **J Neurochem.** 1993 Nov;61(5):1677-84.
101. Pilitsis JG, Diaz FG, O'Regan MH, Phillis JW. Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. **Brain Res.** 2002 Sep 27;951(1):96-106.
102. Seyfried D, Han Y, Zheng Z, Day N, Moin K, Rempel S, et al. Cathepsin B and middle cerebral artery occlusion in the rat. **J Neurosurg.** 1997 Nov;87(5):716-23.
103. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free Radic Biol Med.** 2005 Jun 1;38(11):1433-44.
104. Liao SL, Chen WY, Raung SL, Kuo JS, Chen CJ. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. **Neuroreport.** 2001 Jul 3;12(9):1943-7.
105. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. **J Invest Surg.** 2005 Nov-Dec;18(6):335-50.
106. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx.** 2004 Jan;1(1):17-25.
107. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic pathology: W.B. Saunders Co.; 1997.
108. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, et al. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. **Stroke.** 1998 Feb;29(2):554-62.

109. Blaser T, Hofmann K, Buerger T, Effenberger O, Wallesch CW, Goertler M. Risk of stroke, transient ischemic attack, and vessel occlusion before endarterectomy in patients with symptomatic severe carotid stenosis. **Stroke**. **2002** Apr;33(4):1057-62.
110. Huber R, Muller BT, Seitz RJ, Siebler M, Modder U, Sandmann W. Carotid surgery in acute symptomatic patients. **Eur J Vasc Endovasc Surg**. **2003** Jan;25(1):60-7.
111. Isono M, Ishii K, Kobayashi H, Kaga A, Kamida T, Fujiki M. Effects of indirect bypass surgery for occlusive cerebrovascular diseases in adults. **J Clin Neurosci**. **2002** Nov;9(6):644-7.
112. Hayashi S, Nehls DG, Kieck CF, Vielma J, DeGirolami U, Crowell RM. Beneficial effects of induced hypertension on experimental stroke in awake monkeys. **J Neurosurg**. **1984** Jan;60(1):151-7.
113. Koenigsberg RA, Dave A, McCormick D, Weiss J, Higashida RT, Faro SH, et al. Complicated stent supported cerebrovascular angioplasty: case analyses and review of literature. **Surg Neurol**. **2000** May;53(5):465-74.
114. Nakano S, Yokogami K, Ohta H, Yano T, Ohnishi T. Direct percutaneous transluminal angioplasty for acute middle cerebral artery occlusion. **AJNR Am J Neuroradiol**. **1998** Apr;19(4):767-72.
115. Yoshioka N, Tominaga S, Suzuki Y, Yamazato K, Hirano S, Nonaka K, et al. Cerebral revascularization using omentum and muscle free flap for ischemic cerebrovascular disease. **Surg Neurol**. **1998** Jan;49(1):58-65; discussion -6.
116. Albers GW, Hart RG, Lutsep HL, Newell DW, Sacco RL. AHA Scientific Statement. Supplement to the guidelines for the management of transient ischemic attacks: A statement from the Ad Hoc Committee on Guidelines for the Management of Transient Ischemic Attacks, Stroke Council, American Heart Association. **Stroke**. **1999** Nov;30(11):2502-11.
117. Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. **Lancet**. **1999** Oct 23;354(9188):1457-63.
118. Adams HP, Jr., Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, et al. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association. **Stroke**. **2003** Apr;34(4):1056-83.
119. Lees KR, Dyker AG. Diagnosis and therapeutic aspects of stroke. **Neth J Med**. **1995** Oct;47(4):195-8.
120. Tranmer BI, Gross CE, Keller TS, Kindt GW. Acute middle cerebral artery occlusion: experience with volume expansion therapy. **Neurosurgery**. **1986** Apr;18(4):397-401.
121. Weksler BB, Lewin M. Anticoagulation in cerebral ischemia. **Stroke**. **1983** Sep-Oct;14(5):658-63.
122. Yatsu FM. Acute medical therapies of strokes. **Clin Neurosurg**. **1982**;29:524-33.

123. Katzman R, Clasen R, Klatzo I, Meyer JS, Pappius HM, Waltz AG. Report of Joint Committee for Stroke Resources. IV. Brain edema in stroke. **Stroke**. **1977** Jul-Aug;8(4):512-40.
124. Hoff JT. Resuscitation in focal brain ischemia. **Crit Care Med**. **1978** Jul-Aug;6(4):245-53.
125. Symon L, Harris RJ, Branston NM. Calcium ions and calcium antagonists in ischaemia. **Acta Neurochir (Wien)**. **1982**;63(1-4):267-75.
126. Krieger DW, De Georgia MA, Abou-Chebl A, Andrefsky JC, Sila CA, Katzan IL, et al. Cooling for acute ischemic brain damage (cool aid): an open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke. **Stroke**. **2001** Aug;32(8):1847-54.
127. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**. **1989** Dec;20(12):1627-42.
128. Hof PR, Mobbs CV. Handbook of the Neuroscience of Aging: Elsevier Science; 2010.
129. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol Biochem Behav**. **2007** May;87(1):179-97.
130. Squire LR. Encyclopedia of Neuroscience: ACADEMIC PressINC; 2009.
131. Saivin S, Houin G. Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline. **Clin Pharmacokinet**. **1988** Dec;15(6):355-66.
132. Wilson RC, Kitzman JV, Kemp DT, Goetsch DD. Compartmental and noncompartmental pharmacokinetic analyses of minocycline hydrochloride in the dog. **Am J Vet Res**. **1985** Jun;46(6):1316-8.
133. Liu Y, Ramamurthy N, Marecek J, Lee HM, Chen JL, Ryan ME, et al. The lipophilicity, pharmacokinetics, and cellular uptake of different chemically-modified tetracyclines (CMTs). **Curr Med Chem**. **2001** Feb;8(3):243-52.
134. Wang CX, Yang T, Noor R, Shuaib A. Delayed minocycline but not delayed mild hypothermia protects against embolic stroke. **BMC Neurol**. **2002** Apr 18;2:2.
135. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **1999** Nov 9;96(23):13496-500.
136. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain Res**. **2001** Aug 3;909(1-2):187-93.
137. Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, et al. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **2004** Mar 2;101(9):3071-6.

138. Tikka T, Usenius T, Tenhunen M, Keinänen R, Koistinaho J. Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. **J Neurochem.** **2001** Sep;78(6):1409-14.
139. Feng C, Luo T, Qi L, Wang B, Luo Y, Ge P. Ischemic postconditioning alleviates neuronal injury caused by relief of carotid stenosis in a rat model of cerebral hypoperfusion. **Int J Mol Sci.** **2012**;13(10):13338-51.
140. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin Chem.** **1988** Mar;34(3):497-500.
141. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** **1951** Nov;193(1):265-75.
142. Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. **Clin Chim Acta.** **1993** Jan 31;214(1):103-4.
143. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis: Verlag Chemie; 1974.
144. Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, et al. The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. **Transplantation.** **1994** Dec 27;58(12):1309-16.
145. Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. **Nature.** **1992** Aug 20;358(6388):676-8.
146. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. **Clin Chem.** **1990** Aug;36(8 Pt 1):1440-3.
147. Kavaklı A AA, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna E. Ratlarda Beyin İskemi-Reperfüzyonu Sonucu Oluşan Morfolojik Değişikliklere Melatonin ve Pinealektomi'nin Etkisi. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi.** **2007**;21(2):063-6.
148. Uzar E AA, Fırat U, Evliyaoğlu O, Alp H, Tüfek A, Yavuz C, Demirtaş S, Taşdemir N. Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi. **Türk Nörol Derg.** **2011**;17(3):131-6.
149. Irmak MK, Fadillioglu E, Sogut S, Erdogan H, Gulec M, Ozer M, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. **Cell Biochem Funct.** **2003** Sep;21(3):283-9.
150. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. **J Pharm Pharm Sci.** **2005**;8(3):394-9.
151. Distefano G, Pratico AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Ital J Pediatr.** **2010**;36:63.

152. Altas M, Meydan S, Aras M, Yilmaz N, Ulutas KT, Okuyan HM, et al. Effects of ceftriaxone on ischemia/reperfusion injury in rat brain. **J Clin Neurosci.** **2013** Mar;20(3):457-61.
153. Bakay RA, Ward AA, Jr. Enzymatic changes in serum and cerebrospinal fluid in neurological injury. **J Neurosurg.** **1983** Jan;58(1):27-37.
154. Horn M, Seger F, Schlote W. Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia. **Stroke.** **1995** Feb;26(2):290-6; discussion 6-7.
155. Kittaka M, Giannotta SL, Zelman V, Correale JD, DeGiorgio CM, Weiss MH, et al. Attenuation of brain injury and reduction of neuron-specific enolase by nicardipine in systemic circulation following focal ischemia and reperfusion in a rat model. **J Neurosurg.** **1997** Nov;87(5):731-7.
156. Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, Satoh S, Ogitani E, Fujita S. Relationship between S100beta and GFAP expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia. **Brain Res.** **2004** Sep 17;1021(1):20-31.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ad : Boran

Soyad : URFALI

Doğum Yeri ve Tarihi : Antakya/ HATAY,12.01.1975

Eğitimim :

İlk,Orta ve Lise Öğrenimimi Antakya / HATAY ‘da bitirdim. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’ni bitirdim.

2001-2003 Yılları arasında Yozgat / Çandır Devlet Hastanesi’nde pratisyen doktor olarak çalıştım.

2003-2004 Yılları arasında askerlik görevimi tamamladım.

2005-2006 Yılları arasında özel sektörde pratisyen doktor olarak görev yaptım.

2007 Yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım ve halen görevime devam etmekteyim.

Yabancı Dili :İngilizce