

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BOSENTAN KULLANIMININ
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Eser ATAŞ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. M.Said BERİLGİN

ELAZIĞ

2011

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Bülent MÜNGEN

Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. M.Said BERİLGEN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Bülent MÜNGEN

Prof. Dr. Serpil BULUT

Doç. Dr. M.Said BERİLGEN

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, Nöroloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent MÜNGEN'e, tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle bana her zaman yardımcı olan ve asistanlık eğitimime büyük katkı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. M. Said BERİLGİN'e, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Nöroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Serpil BULUT ve Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Dr. Tuncay KULOĞLU'na, tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Farmakoloji Ana Bilim Dalı'ndan. Dr. Selçuk İLHAN'a,

Ayrıca bir hayat boyu mutlu bir birliktelik yaşamayı dilediğim sevgili eşim İklimya'ya, yine doğduğum günden beri sevgi, şefkat ve dualarıyla her zaman yanımda olan anneme ve babama, beni kendilerinden çok düşünen kardeşlerime sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Onlarla nice güzelliklere...

ÖZET

İnme (stroke) koroner kalp hastalığı ve kanserden sonra ölüme sebep olan üçüncü sıradaki hastalık grubudur. İskemik inme ise serebrovasküler hastalıklara bağlı inmelerin en sık sebebidir.

Apopitozis, beyin parankiminin iskemi sonrası oluşan reperfüzyon ve sekonder doku zedelenmesindeki en önemli mekanizmalardan biridir. Serebral iskemide hücre ölümüne uzanan olayları başlatan birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar, serbest radikal üretimi, eksitoksisite, sodyum ve kalsiyum akışı bozulması, enzimatik değişiklikler, inflamatuvar sürecin uyarılması, trombosit ve lökositlerin aktivasyonu, gecikmiş koagülasyon, endotelial disfonksiyon ve endotelin (ET) salınımını içerir. En önemli faktörlerin başında hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki aşırı artış gelmektedir. Hücre içinde aşırı artan kalsiyum konsantrasyonu fosfalipazlar, proteazlar ve endonükleazlar gibi enzimlerin aktivasyonunu ve serbest radikal oluşumuna yol açan olaylar zincirini başlatır. Ayrıca endotelinlerin ETA ve ETB reseptörlerine bağlanması sonucu hücre içi sinyal sistemleri harekete geçer. Örneğin G proteinlerinin uyarımı sonucu, fosfolipaz C aktivasyonu, inositol fosfat ve diaçilgliserol salınımı ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum düzeylerinin yükselmesi söz konusudur.

Endotelin sisteminin çeşitli biyolojik etkileri nedeniyle ateroskleroz, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, akut koroner iskemik sendromlar ve akut-kronik renal yetersizlikte rol alabileceği düşünülmektedir.

Bosentan, endotelin reseptörleri olan, hem ETA hem de ETB'nin kompetitif antagonistidir. Günümüzde primer (idiyopatik ve ailesel) pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmaktadır. Endotelin antagonistlerinin güçlü vazodilatör etkisi ile birlikte antioksidan özelliği olduğu da bildirilmiştir.

Bu çalışmada iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlara işlem sonrasında 5 gün süre ile düzenli olarak bosentan molekülü uygulandı. Dekapite edilen ratların beyin dokularına histopatolojik incelemeler yapıldı. Beyin dokularında oksidan ve antioksidan düzeyleri belirlendi. Bosentan uygulanan ratların antioksidan düzeylerinin ve histopatolojik incelemelerinin bosentan uygulanmayan gruba göre daha iyi olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak bu alışma bosentanın, iskemik inmenin nron lm ile sonulanan olumsuz etkilerini azaltabilecek bir ajan olabileceğini gstermektedir.

Anahtar kelimeler: İskemik inme, Bosentan, Rat

ABSTRACT

**PROTECTIVE EFFECT OF BOSENTAN INDUCED BY CEREBRAL
ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY IN RATS**

Stroke is the third-ranking disease group causing death after coronary heart disease and cancer. Also ischemic stroke is the most common cause of stroke due to cerebrovascular diseases.

Apoptosis is one of the most important mechanisms in reperfusion and secondary tissue injury occurring after brain parenchyma ischemia. In cerebral ischemia, there are many factors that start the events leading to cell death. These factors contain free radical production, excitotoxicity, sodium and calcium flow disruption, enzymatic changes, stimulation of the inflammatory process, the activation of platelets and leukocytes, delayed coagulation, endothelial dysfunction and endothelin (ET) release. The most important factor among these is the excessive increase of intracellular calcium concentration. Excessively increased intracellular calcium concentration leads to a chain of events such as the activation of phospholipases, proteases and endonucleases and the formation of free radicals. In addition, binding of endothelins to ETA and ETB receptors causes activation of intracellular signaling systems. For example, as a result of G proteins stimulation, phospholipase C activation, release of inositol phosphate and diacylglycerol, and increased level of calcium in intracellular stores occur.

It is thought that endothelin may play a role in atherosclerosis, hypertension, congestive heart failure, acute coronary ischemic syndromes and acute-chronic renal failure due to a variety of biologic effects of endothelin system.

Bosentan, an endothelin receptor, is the competitive antagonist of both ETA and ETB. Today, it is used in the treatment of primary (idiopathic and familial) pulmonary arterial hypertension (PAH). In addition to strong vasodilator effect, it has also been reported that endothelin antagonists have antioxidant properties.

In this study, after ischemia-reperfusion procedure, bosentan molecule was regularly given to rats for 5 days. The brain tissues of decapitated rats were histopathologically examined. The levels of oxidant and antioxidant were determined in these brain tissues. It was observed that antioxidant levels and histopathological examinations were in rats given bosentan better than control group rats.

A result, this study has showed that bosentan may be an agent which could reduce negative effects resulting from neuronal death associated with ischemic stroke.

Keywords: Ischemic stroke, Bosentan, Rat

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Serebrovasküler Hastalıklar	1
1.1.1. Tanım	2
1.1.2. İskemik İnme	2
1.1.3. Epidemiyoloji	2
1.1.4. Risk Faktörleri	3
1.1.4.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri	4
1.1.4.2. Değiştirilebilen risk faktörleri	4
1.1.5. Serebral vasküler anatomi	6
1.1.5.1. Karotis sistem (Ön sistem)	6
1.1.5.2. Vertebrobasiller sistem (Arka sistem)	6
1.1.5.3. Willis poligonu	7
1.1.5.4. Watershed alanlar	7
1.1.6. Fiziopatoloji	7
1.1.6.1. Glutamat Eksitotoksitesi	10
1.1.6.2. Kalsiyum Sitotoksitesi	10
1.1.6.3. Oksidatif Stres	11
1.1.6.4. Nitrik Oksit	11
1.1.6.5. Periyinfarkt Depolarizasyon	12
1.1.6.6. İnflamasyon	12
1.1.6.7. Apoptoz	12

1.1.7. İskemi/Reperfüzyon hasarı	13
1.1.8. Beyin Dokusunda İskemi / Reperfüzyon Hasarı	14
1.2. Oksidatif Stres	16
1.2.1. Anti-Oksidanlar	16
1.3. Endotelinler	17
1.3.1. Yapıları	17
1.3.2. Endotel ve İskemi	18
1.3.3. Endotelin Reseptörleri	18
1.3.4. Endotelin Reseptör Agonist ve Antagonistleri:	19
1.4. Bosentan	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Deney Hayvanları	22
2.2. Gecici Fokal Serebral İskemi Modeli	22
2.3. Histolojik Çalışma	24
2.3.1. TUNEL Metodu	24
2.4. Biyokimyasal Çalışma	25
2.4.1. Beyin Dokusunda TAS, TOS ve OSI Ölçümü	25
2.4.1.1. Total Antioksidan Status	25
2.4.1.2. Total Oksidan Status	25
2.4.1.3. OSI	25
2.5. İstatistiksel Analiz	25
3. BULGULAR	26
3.1. TUNEL Bulgular	26
3.2. TAS, TOS VE OSI değerleri	29
4. TARTIŞMA	30
5. KAYNAKLAR	35
6. ÖZGEÇMİŞ	47

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. TUNEL boyama prosedürü	24
Tablo 2. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi	25
Tablo 3. Beyin dokularındaki TAS, TOS ve OSI değerleri	29

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Serebral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri	15
Şekil 2. Oksidatif Stres	16
Şekil 3. Antioksidan Savunma Sistemleri	17
Şekil 4. Kommon Karotis Arter	23
Şekil 5. Kommon Karotis Arter üzerine anevrizma klipi yerleştirilmiş.	23
Şekil 6. Kontrol Grubunda Tunel + Hücreler	26
Şekil 7. İskemi grubunda artmış Tunel + hücreler	27
Şekil 8. Bosentan grubunda Tunel + hücreler	27
Şekil 9. Pozitif kontrol için meme dokusu	28
Şekil 10. Negatif kontrol	28

KISALTMALAR LİSTESİ

CRP	: C-Reaktif protein
DM	: Diabetes Mellitus
ET	: Endotelin
ETA	: Endotelin A
ETB	: Endotelin B
GA	: Glutamat
GİA	: Geçici İskemik Atak
MDA	: Malondialdehid
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
PAH	: Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon
SOD	: Superoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SPP	: Serebral Perfüzyon Basıncı
SVH	: Serebrovasküler Hastalık
TAS	: Total Antioksidan Status
TOS	: Total Oksidan Status

1. GİRİŞ

İnme; vasküler nedenler dışında kanıtlanabilir nedenler olmaksızın fokal, bazende global serebral fonksiyon bozukluğuna ait bulguların ani yerleşmesi ile 24 saatten daha uzun süren ve ölüme neden olabilen bir klinik sendromdur (1).

İnme ölüm sebepleri içerisinde üçüncü ve sakatlık yönünden de birinci sırada olan hastalık grubudur. Serebrovasküler hastalıkların % 80-85'ini oluşturan iskemik inme, nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan hastalıktır. İnmeyle bağlı oluşan sakatlıklar; kişi, aile ve toplum üzerinde psikososyal problemlere yol açar. Ayrıca sosyal güvenlik sistemi ve aile üzerine ekonomik açıdan belirgin yük getirir. Serebrovasküler Hastalık(SVH)'ların önlenmesi ve tedavisi, bu yönleriyle çok önemli bir halk sağlığı sorunudur (2).

iskemik inme başlangıcından itibaren multiple mekanizmanın beyin hasarına katkısı bilinmektedir.

Bunlar, serbest radikal üretimi, eksitotoksisite, sodyum ve kalsiyum akışı bozulması, enzimatik değişiklikler, inflamatuvar süreç uyarılması, trombosit ve lökositlerin aktivasyonu, gecikmiş koagülasyon, endotelial disfonksiyon ve endotelin (ET) salınımını içerir (3-5).

Endotelinler vücutta doğal olarak oluşan peptidlerdir (6). Bilinen en güçlü vazokonstriktör moleküllerdir (7, 8)

Endotelinlerin ETA ve ETB reseptörlerine bağlanması sonucu hücre içi sinyal sistemlerinin harekete geçtiğini ve bunlar arasında G proteinleri uyarımı sonucu fosfolipaz C aktivasyonu inositol fosfat ve diaçilgliserol salınım ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (9).

Endotelin antagonistlerinin güçlü vazodilatör etkisi vardır ve yakın zamanda antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (10).

Bosentan endotelin reseptörlerinden olan ETA ve ETB'nin kompetitif antagonistidir. Günümüzde halen primer (idiyopatik ve ailesel) pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmaktadır (11, 12).

Son zamanlarda bosentanın invitro olarak serebral vazospazm üzerine etkileri ile ilgili yayınlar görülmektedir (13).

Bu çalışmamızda ET Reseptör Antagonisti olan bosentanın deneysel iskemik model oluşturulan sıçanların beyin dokusunda koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

1.1. Serebrovasküler Hastalıklar

1.1.1.Tanım

Beyin damar hastalıkları (serebrovasküler hastalıklar) beyni besleyen damarların çeşitli patolojik süreçler nedeniyle tıkanması, daralması veya damarın yırtılarak kanın damar dışına çıkması sonucunda ortaya çıkan klinik tablolara denir (14, 15).

Strok ve inme aynı amaçla kullanılan kelimelerdir (14). Bu patolojik süreçler serebrovasküler hastalıkları sadece trombüs, emboli, diseksiyon veya damar yırtılması gibi görünen patolojiler ile değil aynı zamanda aterosklerozis, arteritis, anevrizmal dilatasyon ve gelişimsel malformasyonlar gibi serebral arterlerin primer patolojileri olarakda değerlendirir (15).

Dünya sağlık örgütüne göre inme; vasküler nedenler dışında kanıtlanabilir nedenler olmaksızın fokal, bazende global serebral fonksiyon bozukluğuna ait bulguların ani yerleşmesi ile 24 saatten daha uzun süren ve ölüme neden olabilen bir klinik sendromdur (1).

1.1.2. İskemik İnme

İskemik inme, serebrovasküler hastalıklara bağlı inmelerin en sık sebebidir. Serebrovasküler hastalıklar iskemik (infarkt) ve hemorajik (kanama) olmak üzere iki ana grupta incelenir. Hemorajik inme ise primer intraserebral kanama ve subaraknoid kanama şeklinde ikiye ayrılır (16-18).

Akut iskemik inme fokal serebral kan akımının ani olarak kesintiye uğraması ile gelişir (19, 20) İskemik inmeli hastalarda erken anjiyografi yapıldığında, hastaların % 70-80'inde iskemik inme sebebi olarak embolik veya trombotik oklüzyon gösterilmiştir (21-24).

1.1.3. Epidemiyoloji

İnme ölüm sebepleri içerisinde üçüncü ve sakatlık yönünden de birinci sırada olan hastalık grubudur. Serebrovasküler hastalıkların % 80-85'ini oluşturan iskemik inme, nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan hastalıktır. İnmeye bağlı oluşan sakatlıklar; kişi, aile ve toplum üzerinde psikososyal

problemlere yol açar. Ayrıca sosyal güvenlik sistemi ve aile üzerine ekonomik açıdan belirgin yük getirir. Serebrovasküler Hastalık (SVH)'ların önlenmesi ve tedavisi, bu yönleriyle çok önemli bir halk sağlığı sorunudur (2).

İskemik inme tedavisinde amaç, nörolojik hasarlanmayı en aza indirmek, iskemiye ikincil oluşabilecek ek hasarları engellemek ve hastanın fonksiyonel iyileşmesini kolaylaştırabilecek önlemleri almak olmalıdır (25).

Yaşlara göre yıllık inme insidansı; 55-64 yaşlarında 1,7-3,6/1000, 65-75 yaşlarında 4,9-8,9/1000, 75 yaştan sonra 13,5-17,9/1000 olarak bildirilmiştir (17).

Kadınlarda 55-64 yaş arası inme insidansı erkeklere göre 2-3 kat daha az olup 85 yaşına doğru bu farkın azaldığı görülmektedir (26).

İskemik olaylarda diurnal ve mevsimsel değişiklikler gözlenir, sabah saatlerinde ve kış aylarında iskemik inmenin arttığı gözlenmiştir (17, 27, 28).

Prevelans; belirli bir zaman diliminde bir popülasyondaki eski ve yeni olgu sayısının risk altındaki nüfusa bölünmesiyle elde edilen bir orandır. Yaşla birlikte artan inme prevalansı yaşayabilen hastalara bağlıdır ve coğrafi değişiklikler gösterebilir. Batı ülkelerinde prevalans 8/1000, japonyada 20/1000 iken Türkiye için sağlıklı veriler yoktur (17, 29).

Bogousslavsky ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tüm inmelerin %89'u iskemiktir ve bunların %42'si ateroskleroza bağlı inmeler oluşturmaktadır (30). Türkiyede, Ege Üniversitesinde yapılan çalışmada, tüm inmelerin %77'si iskemiktir, bununda %37'si ateroskleroza bağlı inmelerdir (31). İskemik inmelerde ortalama yaş 63 ± 12 olarak bildirilmiştir (31).

1.1.4. Risk Faktörleri

İskemik inme için risk faktörleri değiştirilemeyen ve değiştirilebilen risk faktörleri olmak üzere iki gruba ayrılır;

İskemik inme için risk faktörleri (28)

1- Değiştirilemeyen risk faktörleri

- Yaş
- Cinsiyet
- Irk, etnik köken
- Aile hikayesi
- Genetik

2- Değiştirilebilen risk faktörleri

- Arteriyel hipertansiyon
- Geçici iskemik atak
- Geçirilmiş inme
- Asemptomatik karotis üfürümü ve stenozu
- Kalp hastalıkları
- Arkus aorta ateromatozisi
- Diabetes mellitus (DM)
- Dislipidemi
- Sigara içimi
- Alkol kullanımı
- Fibrinojen yüksekliği
- Hiperhomosisteinemi
- Düşük serum folat seviyesi
- Artmış antikardiolipin antikorlar
- Hormon tedavisi
- Obezite

1.1.4.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri

İleri yaş inme için en kuvvetli risk faktörüdür. Yaşın ilerlemesi ile birlikte inme insidansı belirgin olarak artar. İskemik inme siyah ırkta beyaz ırktan daha fazla görülür. 75 yaşına kadar iskemik inme erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (28).

1.1.4.2. Değiştirilebilen risk faktörleri

Yaş faktöründen sonra inme için en kuvvetli risk faktörü hipertansiyondur (4).Hipertansiyon en önemli düzeltilebilen risk faktörüdür (28). Hipertansiyon, endotel disfonksiyonu meydana getirerek ve endotelinin lipoproteinlere geçirgenliğini artırarak ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunmaktadır (28). Hipertansiyon ateroskleozu ve kalp hastalığı gelişimini hızlandırarak inme riskini üç ile dört kat artırır (28).

Diabetes mellitus erkeklerde ve kadınlarda diabeti olmayanlarla karşılaştırıldığında iskemik inme riskini iki ile dört kat artırır (16, 17, 28, 32).

Kalp hastalıkları iskemik inme için önemli bir risk grubu olup yapısal kalp hastalıkları ve özellikle atrial fibrilasyon gibi aritmiler embolik inme riskini artırır

(17). Kalp kapak hastalığı, miyokard infarktüsü, kronik arter hastalığı, konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikül hipertrofisi ve mitral kapak prolapsusu iskemik inme riskini artıran diğer kalp hastalıklarındandır (16, 15, 28, 31-34).

Sigara içenlerde iskemik inme riski içmeyenlere göre 2-3 kat artmaktadır (16, 28, 29, 32, 35, 36). Sigaranın kan fibrinojen konsantrasyonunu yükselttiği, trombosit agresyonunu ve hematokriti artırarak kan viskozitesini artırdığı gösterilmiştir (17, 28).

Fazla miktarda alkol alımının kan basıncını, kan trigliserit düzeyini, paroksizmal atrial fibrilasyon ve kardiyomiyopatiyi artırarak inme riskini artırdığı, az miktarda alkol alımının ise inme için bir risk faktörü olmadığı veya riski azalttığı gösterilmiştir (16, 17, 28, 29). Geçici iskemik atak (GİA) daha sonra gelişebilecek olan inme için önemli bir haber vericidir. GİA geçirenlerde yıllık inme riski %1-15 olup bu risk ilk yıl içinde en yüksektir (16, 28).

İnme ile yüksek kolesterol seviyesi arasındaki ilişki koroner arter hastalıklarındaki gibi net değildir. Bununla beraber yüksek serum total kolesterol ve yüksek düşük dansiteli lipoprotein düzeyleri ile ateroskleroz arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (32).

Menapozal dönemde östrojen replasman tedavisinin inme riskini ve mortalitesini azalttığı bildirilmiştir (28). Doğurganlık çağındaki kadınlarda ise inme nadir görülür. İçinde fazla miktarda östrojen bulunan oral kontraseptif kullanan 35 yaş üzerindeki kadınlarda, hipertansiyon, hiperlipidemi ve sigara içimi mevcutsa inme riski rölatif olarak artar (28, 29).

Homosisteinin vasküler düz kas hücreleri için güçlü bir mitojen olduğu gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar hiperhomosisteineminin vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu indükleyerek ateroskleroza hızlandığını öne sürmektedir (37). Serebrovasküler, koroner ve periferik arter hastalığı olan hastalarda hiperhomosisteinemi prevalansı %12-47 arasında değişmektedir (38, 39). Hiperhomosisteinemi ile ilişkili aterosklerotik yatkınlığın temelinde endotel disfonksiyonu ve endotel zedelenmesi olduğu bildirilmiştir. Bunun sonucunda gelişen trombosit aktivasyonu ile trombüs formasyonunun ortaya çıktığı deneysel olarak gösterilmiştir (37).

Antitrombin III, protein-C ve protein-S bozuklukları ile hiperüriseminin inme riskini artırdıklarına dair bildirimler mevcuttur (28, 29). 50 yaşından genç hastalarda GİA ve inme riskini artıran diğer bir risk faktöründe antifosfolipit antikorlardır (28). Plazma fibrinojen düzeyi ile kan viskozitesindeki artış ve hemoglobin ile hematokrit konsantrasyonlarındaki artış iskemik inme gelişimini artırabilir (28). Hiperhomosisteineminin iskemik inme riskini arttırdığına dair bildirimler mevcuttur (28, 29, 37, 40).

İnflamasyonu yansıtan bir akut faz reaktanı olan C-Reaktif Protein (CRP) yüksekliği ile inmeyide içeren vasküler olaylar arasında ilişki olduğunu gösteren bildirimler mevcuttur (41).

1.1.5. Serebral vasküler anatomi

Metabolik olarak vücuttaki en aktif organlardan biri olan beyin bu aktiviteyi sağlayabilmek için zengin bir kan akımına ihtiyacı vardır. Normalde total kan volümünün ortalama %20'sini, glukozun %17'sini kullanan beyin, akciğerler tarafından absorbe edilen oksijenin de %20 kadarını kullanmaktadır (14).

Beyin arteriyel kan akımının kökeni arkus aortadır. Buradan çıkan brakiosefalik arter (sağ subklavian arter ve sağ ana karotid artere ayrılır), sol ana karotid arter ve sol subklavian arterler önde karotis sistemi arkada da vertebrobaziller sistemi oluşturan dallarını verirler. Genel olarak supratentoriyel yapıların arteriyel dolanımını karotis sistem ve vertebrobaziller sistemden ayrılan posterior serebral arter sağlarken, infratentoriyel yapıların arteriyel dolanımını vertebrobaziller sistem sağlar (14).

1.1.5.1. Karotis sistem (Ön sistem)

Sağ ve sol internal karotid arter ve dallarının oluşturduğu sistemdir. Bu sistemde kortikal olarak orta serebral arter frontal, parietal ve temporal lobların lateral yüzlerinin kan akımını sağlar. Anterior serebral arter ise frontal ve parietal lobların medial yüzlerinin arteriyel beslenmesini sağlar (14, 17).

1.1.5.2. Vertebrobaziller sistem (Arka sistem)

Bu sistem sağ ve sol subklavian arterlerden ayrılan vertebral arterler ve bunların ponsun ön yüzeyinde birleşerek baziller arteri oluşturmasıyla meydana gelir (14, 17). Sistemden ayrılan dallar spinal kord, beyin sapı, serebellum, talamus,

internal kapsül, bazal ganglia, oksipital korteks ve inferomezial temporal korteksin arteriel kan akımını sağlarlar (14, 17).

1.1.5.3. Willis poligonu

İnterpedünküler sisterna içerisinde internal karotid arter ve baziller arterin dalları ve bunlar arasındaki anastomozların meydana getirdiği poligondur (14, 15, 28, 29, 32). Willis poligonunu önde anterior serebral arterler ve bunları birleştiren anterior kommunikan arter oluşturur. Arkada ise internal karotidleri posterior serebral arterlere birleştiren posterior kommunikan arterler ve posterior serebral arterler oluşturur (14, 17).

1.1.5.4. Watershed alanlar

Serebral arterlerin terminal dallarının birbirleriyle anastomoz yaptıkları iskemiye hassas ortak sulama alanlarıdır. Bu alanlarda global iskemide çok kısa sürede kalıcı hasar (infarkt) oluşur (14, 18). Bu alanların beyindeki lokalizasyonları şunlardır:

- a. Hemisferlerin üst kısmında anterior ve orta serebral arterlerin terminal dalları arasında.
- b. Parietal ve oksipital lobda orta ve posterior serebral arterlerin terminal dalları arasında.
- c. Hemisferlerin medial kısmında posterior ve anterior serebral arterlerin terminal dalları arasında.

1.1.6. Fiziopatoloji

Beynin enerji kaynağı sadece glukozdur. Beynin enerji depolama özelliği olmadığından hücreler için gerekli olan iyon dengesinin sağlanabilmesi için sürekli ve sabit ATP gereksinimi vardır. Buda süreklilik gösteren kan akımı ile sağlanır (14). Santral sinir sistemi iskemiye en duyarlı organlardan biridir. Oksijen ve glikozun sadece birkaç dakika süreyle bile kritik seviyelerin altına inmesi beyin fonksiyonlarında bozulma ile sonuçlanır. Erişkin bir insanda istirahat halinde 100 gr beyin dokusu bir dakikada 5 mg glukoz, 3-3,5 ml oksijen tüketmektedir (14-16, 28).

Kardiyak output'un %20'sini alarak dakikada ortalama 800 ml kan kullanan beyin dokusunda ortalama kan akımı 50-55 ml /100 gr / dakikadır. Ortalama serebral kan akımı fonksiyonel aktivitenin arttığı beyin bölgelerinde en yüksektir. Bu miktar

gri cevherde 70-80 ml/100gr/dk. iken beyaz cevherde 30ml/100gr/dk. civarındadır (14, 17, 28, 29).

Normal şartlarda beyindeki kan akımını beyin kaidesindeki serebral perfüzyon basıncı (SPP) , kan vizkozitesi ve intrakranial damar çaplarının belirlediği serebrovasküler rezistans belirler. SPP, kanın serebral sirkülasyona yollanmasını sağlayan arteriyel basınç ile venöz basınç farkıdır (14). Serebral damarlar beyinde değişen fizyolojik şartlara göre çaplarını değiştirebilme özelliğine sahiptir ve buna otoregülasyon denir. Otoregülasyonun iki tipi vardır. Birincisi kan ve dokudaki karbondioksit ve oksijen basınçları ve pH değişimlerine göre oluşan otoregülasyon ki buna kemoregülasyon da denir. İkincisi sistemik kan basıncı değişimlerine göre oluşan otoregülasyondur (14, 17). Yaş ilerledikçe otoregülasyon daha az efektif olur. Serebral iskemi, kafa travması, diffüz serebral hipoksi, subaraknoid kanama sonrası vazospazm ve karotis stenozlarında da otoregülasyon bozulabilir (14, 17, 29).

Ortalama arteriel kan basıncının belirli bir düzeye kadar olan düşmesi beyin arteriollerinin vazodilatasyonuna, yükselmesi ise vazokonstriksiyonuna neden olarak serebral kan akımının korunmasını sağlar. Serebral kan akımının korunmasını sağlayan sistemik arteriyel kan basıncı sınırları ortalama 50-160 mmHg arasındadır (14, 17, 29).

Arteriyel kandaki karbondioksit, oksijen ve hidrojen iyon konsantrasyonundaki değişikliklerin serebral kan akımının kontrolünde önemli etkileri vardır. Bunlar içinde en etkili stimulus parsiyel karbondioksit basıncındaki değişiktir. Parsiyel karbondioksit basıncındaki hafif bir yükselme serebral arteriollerin vazodilatasyonuna neden olarak serebral kan akımını belirgin derecede artırır. Ters durumda ise serebral kan akımı azalır (14-17, 32).

Vasküler tıkanma ile oksijen ve glukoz desteğinin kesilmesi, enerji üreten sistemlerdeki bozulmanın sonucunda gelişen hücresel metabolizma değişiklikleri ve hücre membranındaki bozulmalar serebral infarktın temelini oluşturan iki patofizyolojik süreçtir (15).

Beyin kan akımının 30 saniye süreyle kesintiye uğraması sonucunda beyin metabolizmasında değişimler başlar. Bir dakika sonra nöronal fonksiyonlar durur. Beş dakika sonra ise anoksi ve serebral infarkt ile sonuçlanacak olaylar zinciri başlar (15, 16, 28, 32).

Serebral kan akımı 30-35ml/100 mgr/dk. düzeyine geldiğinde ekstrasellüler hidrojen iyon konsantrasyonunda artma olur (17). Membran yetmezliği için eşik kan akımı değeri 8 ml / 100 mg / dk.dır. Bu eşik değerde adenin tri fosfat (ATP) belirgin azalırken hücre içinde kalsiyum, hücre dışında ise potasyum artışı olur. Hücresel asidoz gelişir ve takiben serebral nekrozun histopatolojik bulguları geri dönüşümsüz olarak yerleşir (28). Serebral arter tıkanıklığı olduğu zaman, sınırlı bir bölgede kan akımı kritik seviyenin altına düşer ve doku nekrozu gelişen bu alan iskemik çekirdek olarak adlandırılır. İskemik çekirdeğin etrafında kollateral damarlar tarafından beslenen ve henüz nekroz gelişmemiş alanlar mevcuttur. Bu alanlarda henüz infarkt meydana gelmemiştir. İskemik durum düzeltilmez ise bu bölgenin zaman içinde nekroza gitme olasılığı vardır. Kan akımının azaldığı ancak kalıcı hasarın henüz oluşmadığı beyin bölgesine kurtarılabılır doku (penumbra) adı verilir. Penumbra günümüzde tedavi yaklaşımlarının temel hedefini oluşturur (17).

Penumbra kavramı nöronların elektiriksel olarak sesiz olmakla beraber yapısal bütünlüğünün korunduğu iskemik koşulları tanımlamak için kullanılmaktadır (42).

Penumbra'nın dinamik özellikte olduğu, kendi haline bırakıldığında kısa süre sonra bu bölgede de infarkt oluştuğu bildirilmiştir (43). Bu nedenle "zaman beyindir" anlayışı yerleşmiştir. İskemik çekirdekte, enerji kesilmesi sonucu iyon pompa sistemleri hemen iflas etmişken, penumbra'da elektrik aktivite bozukluğuna rağmen membran hemostazı korunmuştur. Bu nedenle penumbra alanı hem deneysel hemde klinik tedavi çalışmalarında hedef alınan "kurtarılabılır doku"dur (43). Bu ilerleyici bozukluğun 24 saate kadar devam ettiği ve reperfüzyonla geri döndüğü gösterilmiştir (44). Bu da penumbranın dinamik özelliğini ortaya koyan bir tedavi yapılmazsa, kısa sayılacak bir süre içinde geri-dönüşsüz doku hasarının yerleşeceğini göstermektedir (44).

Serebral iskemik dokuda oluşan biyokimyasal kaskadın birçok kademeleri vardır. Yapılan çalışmalar nöron ölümüne yol açan başlıca dört faz olduğunu göstermiştir (14, 32). Bu fazlarda rol oynayan majör mediatörlerin intrasellüler sitozolik kalsiyumun kontrolsüz yükselişi, serbest radikallerin artışı ve asidoz olduğu gösterilmiştir (14, 32).

Bu fazlar;

1. Eksitoksisite
2. Periinfarkt depolarizasyon
3. İnflamasyon
4. Apoptoz, nekroz

1.1.6.1. Glutamat Eksitotoksitesi

Glutamat (GA) beyindeki en önemli eksitator nörotransmitterdir. İskemi ile ilgili yapılan birçok deneysel araştırma, akut fazda dakikalar içinde oluşan bir GA nörotoksitesinin varlığını göstermiştir. Beyinde iskemi ve birçok nörodejeneratif hastalıkta GA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu nöronal harabiyete ve nöron ölümüne yol açar. Bu duruma GA eksitoksisitesi denmektedir (14, 15, 32).

Normal şartlarda GA'nın intrasellüler konsantrasyonu, ekstrasellüler konsantrasyonundan çok daha yüksektir. GA ekstrasellüler mesafeden astrositler ve nöronlar içine Na-K-ATPaz sistemi ile sodyuma bağımlı olarak taşınır. İskemide ise dakikalar içinde ATP azalması ile birlikte oluşan nöronal membran depolarizasyonu Na-K-ATPaz sistemini etkileyerek GA'nın ekstrasellüler konsantrasyonunun artmasına yol açar (14, 15, 32).

Ekstrasellüler GA artışı, N-metil D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna yol açar. Eksitoksisiteden esas sorumlu olan NMDA reseptör aktivasyonudur. Normalde magnezyum ile bloke durumda olan voltaja bağımlı NMDA reseptör kanalı iskemik dokuda açılır ve nöron içine Na^+ , Cl^- ve suyun girmesini sağlayarak hücrede şişme meydana gelmesine sebep olur (1). NMDA reseptör aktivasyonunun uzun sürmesi durumunda ise nöron içine Ca^{++} girerek Ca^{++} 'a bağımlı enzimlerin aktive olmasına ve gecikmiş hücre ölümüne neden olur. GA toksitesinin iskemik penumbranın infarkta dönüşmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (14).

İskemi ile tetiklenen depolarizasyon NMDA reseptör aktivasyonu için uygun ortam hazırlarken, hücre ve doku asiditesi ise bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunu inhibe eder (18, 32).

1.1.6.2. Kalsiyum Sitotoksitesi

Normal beyin dokusunda ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonu intrasellüler kalsiyum konsantrasyonundan 104-105 kat daha yüksektir ve aradaki

fark enerjiye bağımlı olarak düzenlenir. İskemik beyinde oluşan ATP kaybı ile intrasellüler alanda hızlı bir kalsiyum artışı olur (14, 15, 18, 32, 45).

İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artışı durumunda normal fizyolojik yolların aşırı stimülasyonu ile nöronal hasar oluşur. İntrasellüler kalsiyumun artışı nöron içinde kalsiyuma bağlı birçok enzimin aktive olmasına neden olur. Bu enzimler protein-kinaz-C, protein-kinaz-II, fosfolipaz-A2, proteaz, protein fosfotaz, nitrik oksit sentetaz (NOS), endonükleaz ornitin dekarboksilaz ve ksantin oksidaz'dır. Kalsiyuma bağlı bu enzimlerin aktivasyonu serbest radikal oluşumuna lipid peroksidasyonuna ve protein yıkımına neden olarak nöronun harabiyetine yol açarlar (14, 18, 32, 46, 47).

1.1.6.3. Oksidatif Stres

İskemide nöronal harabiyetin oluşumunda öne sürülen teorilerden biride hücre içinde serbest oksijen radikallerinin oluşması yani oksidatif stresdir (49, 50). Serbest radikal en dış yörüngelerinde tek sayılı elektron içeren atom ve moleküllerdir. Normal fizyolojik şartlarda serbest oksijen radikalleri (SOR) hücre içi ve dışı antioksidanlarca inhibe edilir ve ortamdan uzaklaştırılır (14, 48). Başlıca üç çeşit SOR vardır. Bunlar süperoksid anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-)'dir. Hücre içinde SOR'ların aşırı artışı durumunda antioksidanların inhibe edici etkileri yetersiz kalır. Özellikle hücredeki intrasellüler kalsiyumun artışı ile aktive olan enzimlere bağlı gelişen SOR artışı nörondaki oksidatif stresin esas nedenidir. Böylece artan SOR'lar mitokondri DNA'sını, lipitleri, proteinleri ve diğer molekülleri zedeleyerek hücre hasarına neden olurlar (14, 49, 50).

İskemik dokunun reperfüzyonu iskemi sırasında meydana gelen bazı süreçleri geri çevirir. Fakat bu dokunun ani ve fazla miktarda oksijene maruz kalması durumunda oluşan serbest oksijen radikalleri nöronal hasarı derinleştirebilmektedir (51).

1.1.6.4 Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) vazodilatör ve hücre içi sinyal iletiminde etkili bir moleküldür. Kan basıncı ve vasküler tonusun düzenlenmesi, trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibe edilmesi, permeabilite ve sinaptik transmisyon gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları mevcuttur. Bir nörotransmitter olarakda değerlendirilir (18).

Serebral iskeminin ilk saatlerinde fizyolojik sınırlarda NO salınımı kan akımını artırarak enfarkt alanını sınırlar. Yüksek oranda NO salınımı ise mitokondriyal solunumu inhibe eder, glikolizi baskılar ve hücre içi glutatyon düzeyini azaltarak sitotoksositeye neden olur. DNA sentez ve yapısını bozar (18).

1.1.6.5. Periinfarkt Depolarizasyon

Serebral infarkt çevresindeki sınır bölgede tekrarlayıcı bir şekilde yayılan depresyon benzeri depolarizasyonların fokal serebral infarktın genişlemesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Bu depolarizasyon dalgaları enerji ihtiyacını karşılamada güçlük çeken penumbra daha fazla enerji açığına yol açar ve her depolarizasyonda iskemik çekirdek büyür (52-59).

1.1.6.6. İnflamasyon

İskemik inmede beyin dokusunda inflamasyonun etkileri farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. İnflamasyonun inme kliniğini ve oluşan infarkt dokusunun hacmini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca bu inflamatuvar sürecin semptomların ortaya çıkışından sonraki günlerde de devam ettiği gösterilmiştir (14, 32).

Lökositler tarafından infiltre edilen iskemik dokudaki mikroglia ve astrositlerden, inflamatuvar cevabın önemli bir göstergesi olan tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interlökin- 1A (İL-1A) gibi sitokinler açığa çıkar. Sitokinler endotel hücreleri, lökositler ve plateletlerden adhezyon moleküllerinin salınımını artırıp iskemik doku harabiyetini daha fazla artırarak nöron ölümüne neden olurlar (14, 32).

1.1.6.7. Apoptoz

Apoptoz yavaş gelişen, genetik kontrol altında oluşan programlanmış hücre ölümüdür ve hücre kendi ölümünde rol alan proteinleri sentez etmektedir (14, 32, 60, 61).

Hücre içi kalsiyumun ve serbest radikallerin artışı apoptoza yol açan uyarılardandır. Artmış kalsiyum ve serbest oksijen radikalleri spesifik gen transkripsiyonları ve protein sentezine neden olur. Diğer bir deyişle aslında iskemik süreç protein ve mRNA sentezini azaltırken aynı zamanda 100 kadar geni aktive ederek yeni protein sentezine neden olmaktadır (14, 32, 62, 63).

Apopitotik hücre ölümünün oluşmasında kaspaz adı verilen proteolitik enzimlerin önemli rolü vardır. Kaspaz inhibitörlerinin verildiği deneysel fokal iskemi modellerinde iskemik hasarın azaldığı gösterilmiştir (14, 18, 32, 64).

1.1.7. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İskemi/reperfüzyon hasarı, yetersiz oksijen sunumu ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin ve immün sistemin rol aldığı ikincil inflamatuvar yanıtla genişleyen, karmaşık bir süreçtir. Dokunun hipoperfüzyonu ile oluşan hasarlanma ekstremitte iskemisi, serebrovasküler olay veya miyokard infarktüsü gibi farklı klinik sonuçlarla ortaya çıksa da hücresel düzeydeki patolojik süreçlerin evreleri benzerdir (65, 66).

Dokuya giden kan akımı kesintiye uğradığı zaman hücresel disfonksiyona yol açan ardışık kimyasal olaylar tetiklenir. Hücresel homeostazın bozulmasına ve hücre ölümüne neden olan süreç hızla ilerler. Oksidatif fosforilasyon kaybı ve Adenin Trifosfat (ATP) düşüşünün eşlik ettiği asidoz, kromatin kümelenmesi, piknoz gibi olaylar sonucunda oluşan plazma membran değişiklikleri hücresel iyon dengesini bozar. Hücre içine Na iyonu ile birlikte su girişi olurken, K iyonu interstisyuma geçer. Hücre içinde artan Ca iyon yükü mitokondri membranının fonksiyonunu bozar. Endoplazmik retikulumun veziküllenmesi, lizozomların şişerek patlaması, enzim ve proteinlerin kaybı, sellüler kompartmanların dağılması ve membran bütünlüğünün bozulmasıyla otoliz ve hücre ölümü gerçekleşir (66, 67).

Hücresel disfonksiyonun derecesini iskeminin genişliği ve süresi belirler. Yeniden kan akımının sağlanması olarak tanımlanan reperfüzyon, hücresel disfonksiyonun geri dönebilmesi için gerekli olmakla birlikte tehlikeli metabolik sonuçlara da neden olur. Bölgesel doku hasarını genişletebilir ve toksik metabolitlerin genel dolaşıma geçmesini sağlayarak sistemik hasara yol açabilir (67, 68).

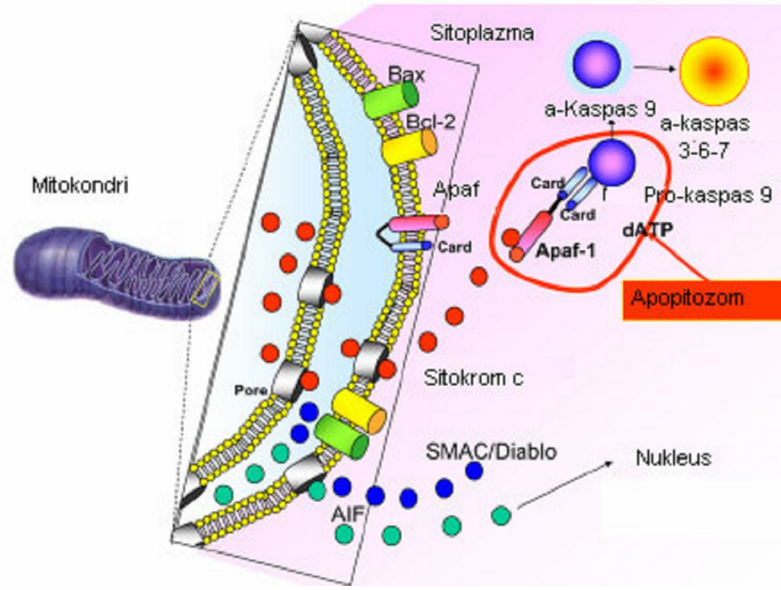
Doku hasarının oluşumunda reperfüze dokularda biriken nötrofillerin aktif rol oynadığını gösteren birçok kanıt mevcuttur. Nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlatılmasında serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksitler sorumlu tutulmaktadır (69).

1.1.8. Beyin Dokusunda İskemi / Reperfüzyon Hasarı

İskemiye duyarlılığı son derece yüksek olan beyin dokusunda iskemi sırasında, hücre düzeyinde giderek artan enerji eksikliği hücre içi asidoza neden olur. Bunun sonucunda proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezi durur. Hücre membranındaki iyon pompalarının çalışmaması sonucu hücre içi ve dışı iyon dengesi bozulur. Böylece hipoksantin ve ksantin gibi ATP yıkım ürünleri hücre içinde birikir. Tüm bu süreçlerin sonunda ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücrenin makromoleküllerini zedeleyerek hücre ölümüne neden olur (67, 70-73).

Serbest oksijen radikalleri hücre içinde apoptotik süreci ve eksitotoksik nöron hasarını başlatan yolları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Apoptotik nöron ölümü in vitro ve invivo global-fokal iskemi/reperfüzyon modellerinde çalışılmıştır. Apoptozise, hücre içi yaşam/ölüm sinyal yollarının aktivasyonu neden olur. Hücre içi ölüm sinyal yolları mitokondri ve hücre ölüm reseptör ailesi ile ilişkilidir (72).

Mitokondrideki hücre ölüm sinyal yollarından biri olan sitokrom c, mitokondri membran proteinlerinden biridir ve aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirinde yer alır. Geçici fokal iskemiye maruz bırakılmış serebral dokuda mitokondriden sitozolik kompartmana salınır. Geçici global iskemiye maruz kalmış serebral dokuda, hipokampal nöronlarda sitozolik sitokrom c artışı gözlenir. Sitokrom c CED-4 homolog, Apoptotik proteaz active edici faktor (Apaf-1), Deoksiadenozin Trifosfat ile etkileşerek apoptozomu oluşturur. Aynı zamanda aspartate-spesifik sistein proteaz'ı (kaspas-9) aktive eder. Sitokrom c ilişkili kaspas kaskadının başlangıcı olan kaspas-9 sırasıyla kaspas-3,-2,-6,-8 ve -10'u aktive eder. Kaspas-3, kaspas-3 ilişkili Deoksiribonükleik asit proteaz'ı (DNAaz) aktive ederek DNA hasarına yol açar (Şekil 3) (65-67, 69).



Şekil 1. Serebral iskemi sonrası mitokondrideki oksidatif stres sinyalleri (65).

Apoptozisin reseptör ailesi, tip 1 glikolize transmembran (FAS) reseptörleri ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkilidir. Ekstraselüler Fas ligandı reseptöre bağlandığında bir adaptör protein olan Fas ilişkili ölüm domain proteini sentezlenir ve bu protein prokaspas-8'i aktive eder. Kaspas-8, kaspas-3, Poliadenindifosfat-riboz polimeraz (PARP) ve aktive Kaspas ilişkili Deoksiribonükleikaz (CAD) yoluyla DNA hasarı ilişkili hücre ölümüne neden olur (67).

İskemi sonucu gelişen eksitotoksik nöron ölümünde mekanizma eksitator nörotransmitterler ile ilişkilidir. Nöronal hücrede ATP bağımlı iyon kanallarının iskemi sonucu çalışamaz hale gelmesi, membran bütünlüğünde bozulmaya yol açar. Hücre içinde depolanmış durumda bulunan glutamat gibi ekstatör nörotransmitterlerin ortama salınması ile glutamat konsantrasyonu 3-10 kat artar. Glutamati hücre içine alan enerji bağımlı mekanizmaların da çalışmaması ile ortamda biriken glutamat, glutamat reseptör alt tipi olan NMDA reseptörünün aktivasyonuna neden olur. NMDA reseptörünün aktivasyonu nöronda aşırı depolarizasyon oluşturur. Nöronda meydana gelen bu aşırı aktivasyon hücre içi iyon dengesini bozar ve hücre içinde aşırı kalsiyum birikmesi ile eksitotoksik hücre ölümü meydana gelir (67, 70, 74).

Sonuç olarak, beynin vasküler yapıları ve parankim dokusu iskemi/reperfüzyon sonucu gelişen olayların kümülatif etkileri ile ortaya çıkan iskemi/reperfüzyon hasarına uğrar (69-71, 74, 75).

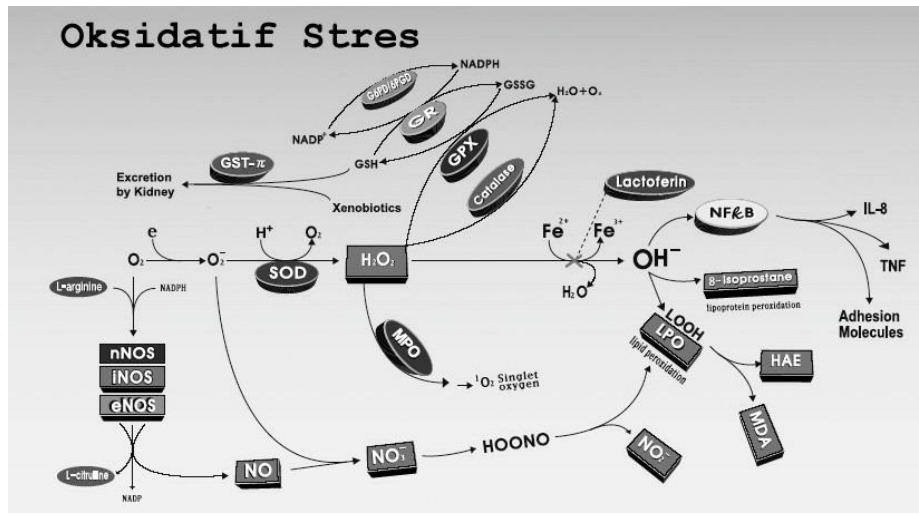
1.2. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Şekil 1) (76).

1.2.1. Anti-Oksidanlar

SOR’ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “Antioksidan Savunma Sistemleri” olarak bilinirler (Şekil 3).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (77) .



Şekil 2. Oksidatif Stres (www.woongbee.com)



Şekil 3. Antioksidan Savunma Sistemleri (77)

1.3. Endotelinler

Günümüzde endotel çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan çok fonksiyonlu otokrin ve parakrin bir organ olarak kabul edilmektedir (78). Endotelinler vücutta doğal olarak oluşan peptidlerdir (6). Bilinen en güçlü vazokonstrüktör moleküllerdir (7, 8).

İlk defa 1985 yılında Hickey ve ark. (79) tarafından, “endotensin veya endothelial contracting faktör” olarak tanımlandılar. 1988 yılında Yanagisawa ve ark. (80) tarafından, kültürü yapılmış domuz aort endotel hücrelerinden izole ve pürifiye edildiler.

Kimyasal yapıları, akrepler ve Antractaspis engaddensis tarafından yapılan ve bir nörotoksin olan sarafatoksinlere benzer. Endotelinler değişik organizmaların çeşitli hücre kültürlerinden elde edilmişlerdir (81). Geniş dağılımı, otojenite ve erişkin hayat esnasındaki ekspresyonları hücre içi faktörler olarak primer rolleri ve biyolojik etkilerinin kompleksliği nedeniyle otokoidler ve sitokinler olarak kabul edilmektedirler (82).

1.3.1. Yapıları

Endotelinler ve sarafatoksinler süperailesi her biri dörder üyeli iki temel kola ayrılırlar (6).

Endotelinler 21 aminoasitten oluşan polipeptidlerdir (83-85). Yapılarına katılan aminoasitler arasındaki çok az farklılıklarla; Endotelin-1 (ET1), Endotelin-2 (ET2) ve Endotelin-3 (ET3) olmak üzere üç izoformu vardır (86, 87). Endotelin-4 ise vazoaktif intestinal konstrüktör diye de adlandırılmıştır ve ET2’nin sıçanlara ait formu olduğu kabul edilmiştir (6).

Endotelinler lineer peptidler olup, üç boyutlu yapıları ile konikal bir spiraldir. Karboksil ucundaki 7. ve 11. aminoasitler ile amino ucundaki 1. ve 3. aminoasitler arasında iki tane zincir içi disulfid bağı vardır. Bu bağlar üç boyutlu yapı ve fonksiyonlarla ilişkili olarak biyolojik anlam taşıyabilir (88). İzopeptitler arasındaki temel fark amino ucundaki segmentlerdedir (6).

Endotelinler, endotelial ve nonendotelial hücreler tarafından oluşturulmaktadır (6, 88) Endotelinlerin salınımına sebep olduğu bilinen faktörler; trombin, transforming growth factor- β , arjinin- vazopressin, hipoksi, glukoz, anjiotensin II, siklosporin, insulin-like growth factor, bombesin, kortizol, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), hiperkolesterolemi ve iskemidir (84, 89).

1.3.2. Endotel ve İskemi

Endotelin antikorları ratlarda in vivo post-iskemik böbrek kan akımını artırır (90). Miyokard enfarktüsündeki olası rolü endotelin antikor infüzyonunun hayvanlarda enfarkt boyutunu sınırlayabilmesinin saptanması ile güçlenmiştir (91). İskemik durumlar altında endotelinlerin vazoaktif etkileri artar ve böylece hipoksi hem endotelin üretimini hem de etkinliğini artırmış olur.

Laboratuvar ve klinik araştırmalar ET'lerin subaraknoid kanama ve iskemik inmede geç gelişen vazospazmın patogeneğinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu hastaların serebrospinal sıvılarında, ET konsantrasyonlarının yükseldiği gösterilmiştir. Endotelin reseptör inhibitörlerinin, serebral vazokonstriksiyonu önlemesi ve nöral ölümü geciktirmesi, bu ajanların subaraknoid kanamanın tedavisinde kullanabileceğini düşündürmektedir (6).

1.3.3. Endotelin Reseptörleri

Endotelin reseptörleri ve bunların gen kolonları izole edilmiştir (7, 92). Reseptörler, endotelin izoformlarına gösterdikleri aktiviteye göre sınıflandırılmıştır. Yakın zamana kadar endotelin A (ETA) ve endotelin B (ETB) diye iki endotelin reseptörü tanımlanmıştı (93).

İnsanlardaki ETA ve ETB reseptörleri anlamlı benzerlik gösterirler. Çeşitli reseptör subtiplerinin varlığı da ispatlanmıştır. Reseptörler glikoproteinlerden oluşmuşlardır. Şeker bölümleri ligant ilişkileri için muhtemelen en önemli parçalarıdır. Reseptörlerin üçüncül yapıları da tayin edilmiştir. ETA ve ETB reseptörleri arasındaki fark karboksil ucundadır (6). ETA reseptörü, en yüksek

afiniteyi ET1'e gösterirken, ET2'ye olan afinitesi ET3'ten fazladır. ETB reseptörü her üç izoforma eşit derecede afinite gösterir. Endotelin reseptörleri B1, B2, 5HT1, 5HT2, V1 ve V2 reseptörlerini de içeren Rodopsin süperaillesine dahildirler (6). Bu reseptörlerin yedi adet transmembran segmenti vardır. Etkilerini G-proteinler aracılığı ile oluştururlar. G-proteinlerinin inhibitör, stimülatör ve diğer birçok tipi vardır. Ligantların reseptöre bağlanması aynı anda G-proteinlerinde değişikliğe sebep olan allosterik bir etki uyarır. G-proteinleri ile reseptörler yapısal olarak birleşmezler (86). Reseptörün üçüncü intrasellüler loop'u G-proteini ile ilişkiden sorumlu olan bölgedir. Ancak ligantlar ile ilişkiden sorumlu bölgeleri tam olarak bilinmemektedir (6). ET reseptörlerinin çeşitli dokulardaki farklı dağılımı, endotelinlerin farklı etkiler oluşturmalarına sebep olur. Endotelinlerin reseptörlerine bağlanması çok sıklıdır ve rölatif olarak yavaş ayrılırlar. Etki sürelerinin uzunluğu buna bağılı olabilir. Bir diğer önemli faktör de, in-vitro görülen bazı etkiler, in-vivo biyolojik olaylarla uyumlu olmayabilir (94). ETA reseptörleri kalp, beyin, damarlar ve damar düz kas hücrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. ETB reseptörleri ise böbrekler, uterus, santral sinir sistemi ve endotel hücrelerinde daha yoğun olmak üzere, çok geniş bir dağılım gösterirler (6, 92).

1.3.4. Endotelin Reseptör Agonist ve Antagonistleri:

Şimdiye kadar 3 ET reseptör alt tipi tanımlanmıştır. Arai ve ark. (95) ve Sakurai ve ark. (96) ET1 için yüksek affinite gösteren bir ETA reseptörü ve ET1 ve ET3 için eşit affinite gösteren bir ETB reseptörü bildirdiler. ETA reseptörü ET1'in vazokonstrüktör etkisi için predominant etkiye sahiptir. Endotelyal hücrelerde bulunan ETB reseptörü ise endotel-bağımlı gevşemeye aracılık eder (97). Son olarak bazı düz kas hücrelerinde bulunan ve vazokonstrüksiyona aracılık eden ETB benzeri bir reseptör in vitro ve in vivo farmakolojik kanıtlara dayanarak tanımlandı (98,99). ETB reseptörlerin her iki formu sarafotoksin S6C veya BQ-3020 gibi selektif ETB agonistleri tarafından aktive edilir. Aktivasyonundan kaynaklanan etkiler BQ-123 gibi ETA selektif antagonistlere duyarsızdır. Karışıklığa yol açmamak için endotel bağımlı gevşeme ve vazokonstrüksiyona aracılık eden ETB reseptörleri sırasıyla ETB1 ve ETB2 olarak tanımlanacaktır. IRL 1038 gibi bazı ligandlar ETB1'in etkilerini inhibe ederken ETB2 reseptör stimülasyonunu inhibe edemez yani alt tip seçiciliğı gösterir (100).

ET1 fokal veya sistemik vazokonstriksiyon, hücre proliferasyonu, bronkokonstrüksiyon veya inflamasyonla ilişkili kronik ve akut hastalıklarda bir rol oynayabilir (101). Clozel ve ark. (100) oral olarak aktif ilk endotelin reseptör antagonisti olarak Ro 46-2005'i tanımladılar. Daha sonra Ro 46-2005'in yapısal optimizasyonu ile elde edilen Ro 47-0203 veya 4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamide olarak da adlandırılan bosentanin farmakolojik özelliklerini bildirdiler. Sonuçlar gösterdi ki bosentan her üç endotelin reseptörünü de (ETA, ETB1 ve ETB2) bloke eder, endotelin için son derece spesifiktir ve oral olarak aktiftir (100).

Streptomyces misakiensis'in kültür ortamından izole edilmiş bir peptidin yapı-fonksiyon çalışmalarından geliştirilen BQ123'ün güçlü, selektif bir ETA reseptör antagonisti olduğu gösterilmiştir (102). BQ123'ün izole domuz koroner arter preparatlarında ET1 ile indüklenmiş kasılmaları antagonize ettiği bildirilmiştir (102). Fakat insan nöroblastomundan elde edilen SK-N-MC hücrelerinde BQ123'ün E1 ile indüklenmiş hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışın güçlü ancak nonkompetitif bir antagonisti olduğu görülmüştür (103).

1.4. Bosentan

Ro 47-0203 veya 4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamide olarak da adlandırılan bosentan her üç endotelin reseptörünü de (ETA, ETB1 ve ETB2) bloke eder. Endotelin için son derece spesifiktir ve oral olarak aktiftir. Bosentan endotelin reseptörlerinin mikst ve kompetitif bir antagonistidir (100).

Bosentanin inhibitör potensi rekombinant insan reseptörlerinde ve insan ve hayvan kaynaklı doğal reseptörlerde test edildiğinde insan ve hayvan reseptörleri arasında bağlanmasında önemli farklılık olmadığı görülmüştür. Bosentanin hem bağlanma çalışmalarında hem de fonksiyonel çalışmalarda bosentan ETA reseptörleri üzerine daha potent olduğu bildirilmiştir (100). Bosentanin ETB1 ve ETB2 reseptörleri için bağlanma affinitesi ETA reseptörleri için olan bağlanma affinitesine göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (100). Bosentan insan düz kas hücreleri ve rat mezenşiyal hücrelerindeki ETA reseptörlerine bağlanmak için I^{125} -işaretli ET1 ile eşit güçte yarışır. Endotelin reseptörlerinin %90'dan fazlası ETB reseptörü içeren

insan plasenta membranları gibi dokularda bosentan, ETA reseptörü taşıyan hücrelerdekinden 20-30 kat daha düşük potens gösterdiği bildirilmiştir (100).

Bosentanın kendisi kan basıncı üzerine etkili değildir. Yine de hem oral hem de IV uygulamadan sonra ET1 reseptörler üzerine etki ederek endotelinin pressor etkisini belirgin olarak inhibe eder (100).

Bosentan günümüzde primer (idiyopatik ve ailesel) pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), ciddi interstisyel pulmoner hastalık olmaksızın sklerodermaya sekonder gelişen PAH, sistemik-pulmoner şantlarla ve Eisenmenger fizyolojisiyle ilişkili PAH'ta tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır (11, 12).

Son zamanlarda bosentanın invitro çalışmalarda serebral vazospazm üzerine etkileri çalışılmaya başlanmıştır (13).

Patel ve arkadaşları geçici global iskemi modelinde bosentanın etkinliğini değerlendirmişlerdir (104). Bosentanın postiskemik hipoperfüzyonda minimal etkisini tespit etmişlerdir (104).

Endotelin antagonistlerinin güçlü vazodilatör etkisi vardır ve yakın zamanda antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (10). Endotelin antagonistlerinin iskemi modellerinde tespit edilen koruyucu özellikleri antioksidan etkileriyle de ilişkili olabilir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca deneysel çalışmamızın etik onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen herbirinde rastgele seçilmiş 7 rat olan üç deney grubu oluşturuldu;

Grup 1 (K): İskemi yapılmayan kontrol grubu (N=7)

Grup 2 (İK): İskemi -kontrol grubu (N=7)

Grup 3 (İB): 5 gün yaşatılan iskemi-bosentan grubu (N=7)

Kontrol grubu, sağlıklı beyindeki apopitozis ile iskemi +/- ilaç gruplarını karşılaştırabilmek için sakrifiye edildi. Diğer iki gruba iskemi oluşturmak ve sakrifiye etmek için aynı cerrahi prosedürler uygulandı. Daha önceki çalışmalar göz önünde tutularak ilaç gruplarına bosentan 30mg/kg/gün intraperitoneal yolla, oluşturulan travmanın 30. dakikasında ve takiben her gün aynı saatte, günde bir kez, 5 gün boyunca verildi (102).

2.2. Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli

200-220 gr ağırlığında 21 adet erkek, Wistar cinsi albino rat deney için kullanıldı. Bu hayvanlar gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlanan ve sıcaklığı 21°C olan bir odada tutuldu. Her bir kafeste 4 hayvan vardı. Bunlara su ve yem alımları serbest bırakıldı.

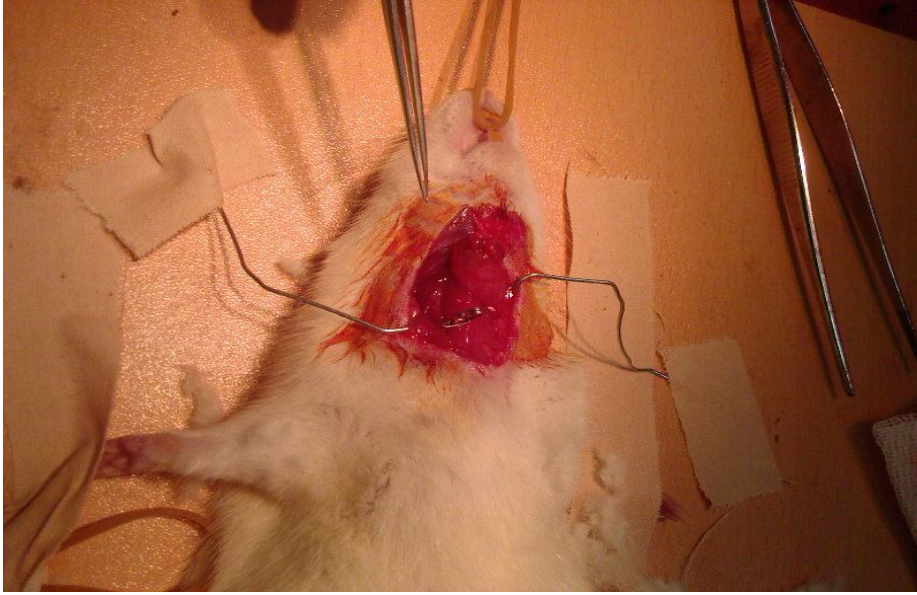
Hayvanlarda genel anestezi intramusküler yolla 10mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul/Türkiye) ve 50mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul/Türkiye) ile sağlandı. Anestezi derinliği her 15 dakikada bir, kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi. Ratların vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçülerek 37°C civarında tutuldu. Tüm cerrahi uygulamalar mikroskop (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) altında gerçekleştirildi.

İkinci ve üçüncü gruptaki ratlar supin pozisyonda operasyon masasına sabitlendi. Sonra boyun orta hattı traş edildi. Operasyon bölgesi dezenfekte edildikten sonra orta hat insizyonu yapıldı. Yüzeysel mikrodisseksiyon yapıldıktan sonra derin mikrodisseksiyon ile sağ kommon karotis artere doğru ilerlendi. Trakea görülüp paratrakeal kaslar disseke edilerek kommon karotis artere ulaşıldı (Şekil 4).



Şekil 4. Kommon Karotis Arter

Karotis bifurkasyondan 1 cm ile 3 cm proksimalden, common carotis arteri üzerine, proksimal ve distal kontrolü sağlamak amacıyla iki adet Yaşargil anevrizma klipi yerleştirildi (Şekil 5).



Şekil 5. Kommon Karotis Arter üzerine anevrizma klipi yerleştirilmiş.

On dakika boyunca klipler kapalı tutuldu. Birinci gruptaki ratlara ise sadece deri altı kesi yapıldı. Arter ligasyonu yapılmadı. Tüm ratların açılan kesileri on dakika sonra sütürlendi. Birinci gruptaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmadı. İkinci gruptaki ratlara klipler açıldıktan 30 dakika sonrasında ve takip eden 5 gün boyunca günde birkez %0.9 salin 30 mg/kg intraperitoneal uygulandı. Üçüncü gruptaki ratlara ise klipler açıldıktan 30 dakika sonrasında ve takip eden 5 gün

boyunca 30 mg/kg intraperitoneal bosentan uygulandı. Tüm ratlar 5. gün sonunda ketamin hidroklorür 100 mg/kg ve 10 mg/kg xylazine intraperitoneal uygulanan anestezi sonrasında dekapite edildi ve 8 cc kan örneği alındı.

2.3. Histolojik Çalışma

2.3.1. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apopitoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. TUNEL boyama prosedürü

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +distile su (68ml) oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apopitotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 2).

Tablo 2. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.4. Biyokimyasal Çalışma

2.4.1. Beyin Dokusunda TAS, TOS ve OSI Ölçümü

2.4.1.1. Total Antioksidan Status

Total antioksidan status (TAS) ölçümü, Özcan Erel tarafından tanımlanan total antioksidan aktivite metodu kullanılarak yapıldı (103). Ölçümün sonuçları μmol Trolox equivalent/l olarak birimlendirilmiştir.

2.4.1.2. Total Oksidan Status

Total oksidan status (TOS) ölçümü, Özcan Erel tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı (104). Ölçümün sonuçları $\text{mmol H}_2\text{O}_2$ equivalent/l olarak birimlendirilmiştir.

2.4.1.3. OSI

OSI değeri TAS ve TOS değerlerinin % oranı olarak kabul edildi. Öncelikle TAS değerleri mmol/l ye çevrildi. OSI değeri Formula yöntemine göre hesaplandı (105). $\text{OSI (Arbitrary Unit)} = \text{TOS (mmol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/l)} / \text{TAS (mmol Trolox equivalent/l)}$.

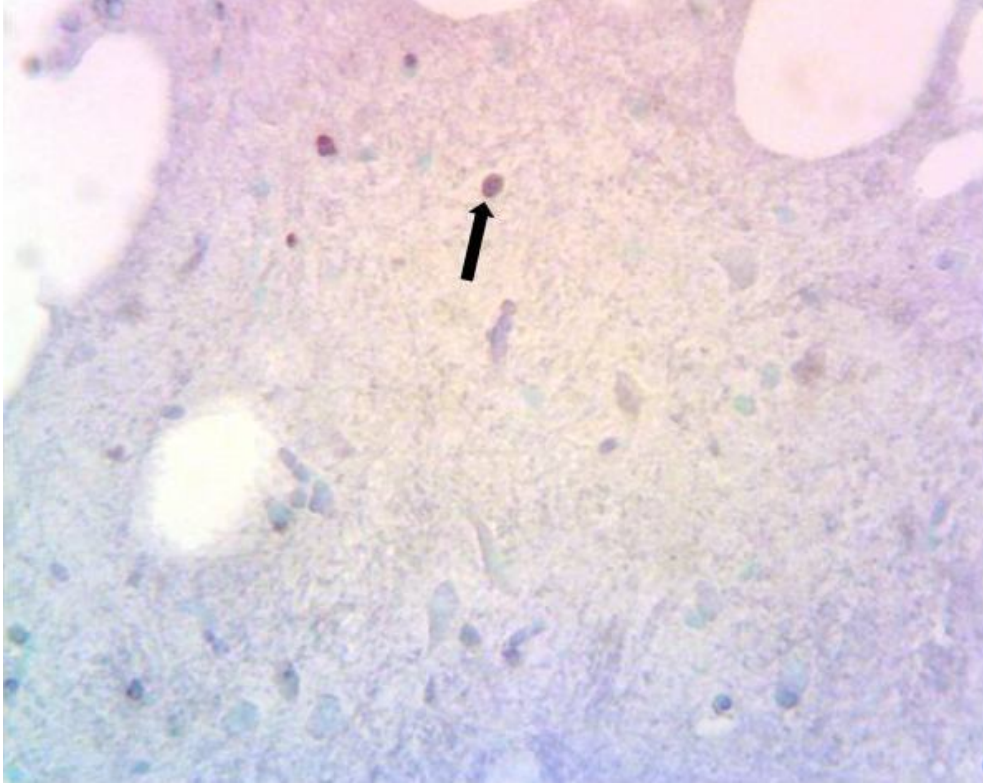
2.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri ANOVA testi ile belirlendi. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

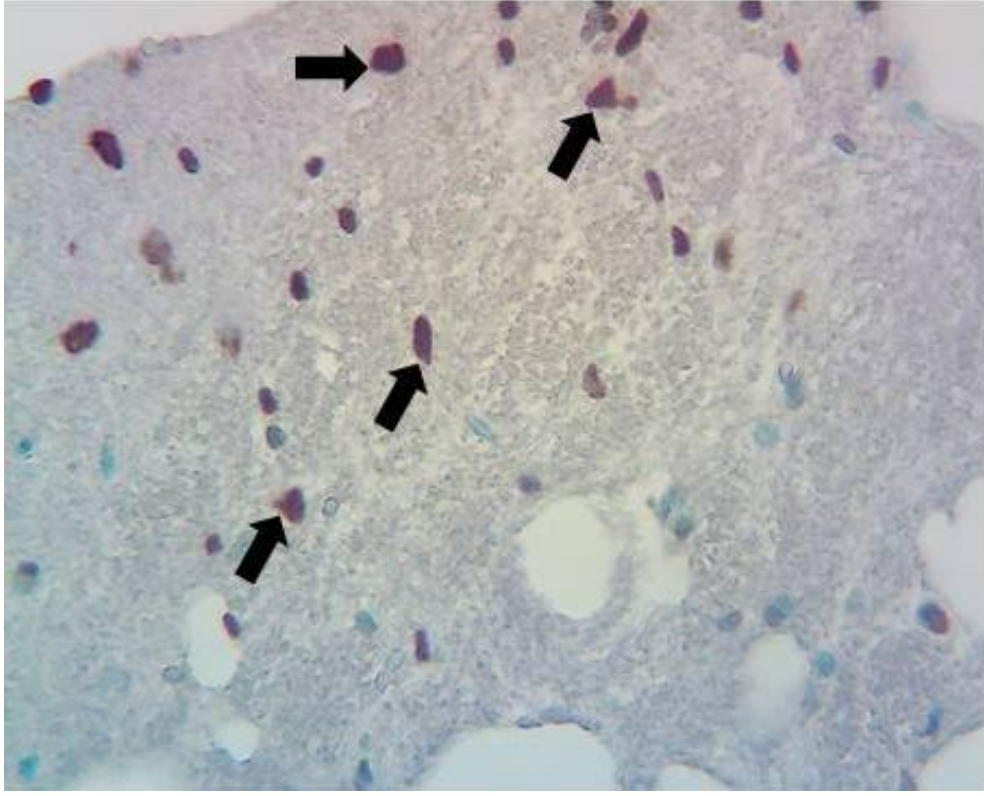
3. BULGULAR

3.1. TUNEL Bulgular

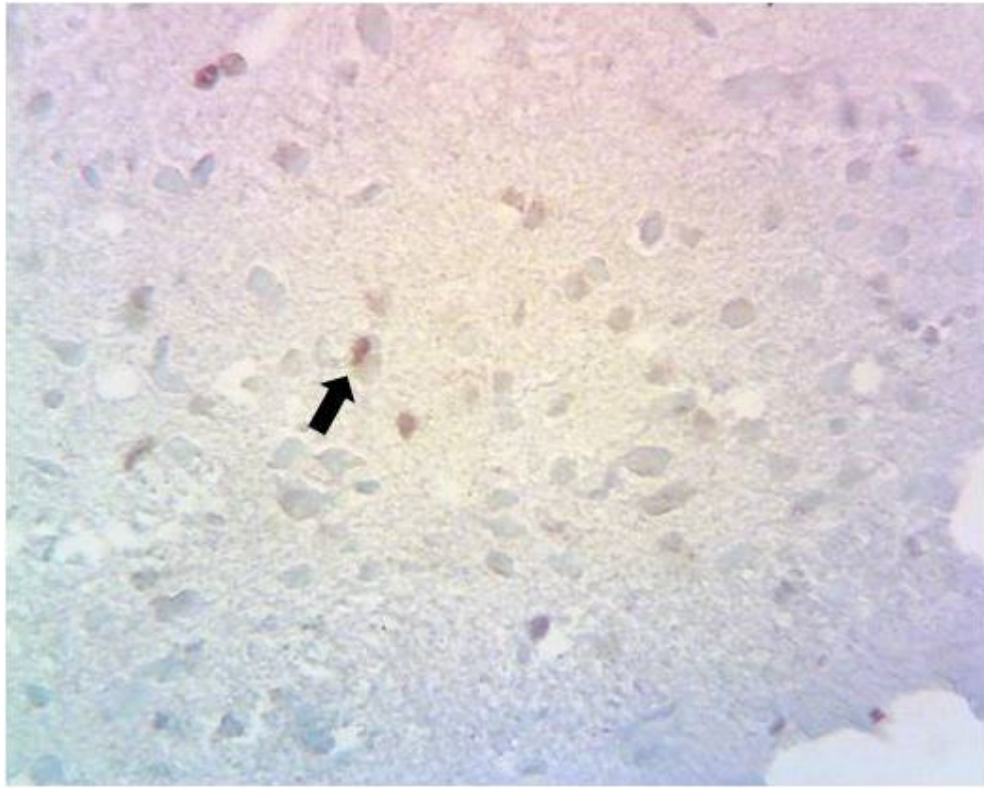
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucunda şu bulgular elde edildi. TUNEL pozitifliği kontrol grubunda +1 olarak değerlendirildi. (Şekil 6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iskemi grubunda belirgin bir artış vardı ve +2 olarak değerlendirildi. (Şekil 7). Bosentan verilen tedavi grubunda ise iskemi grubuna göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +1 olarak değerlendirildi (Şekil 8). Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı (şekil 7). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 9).



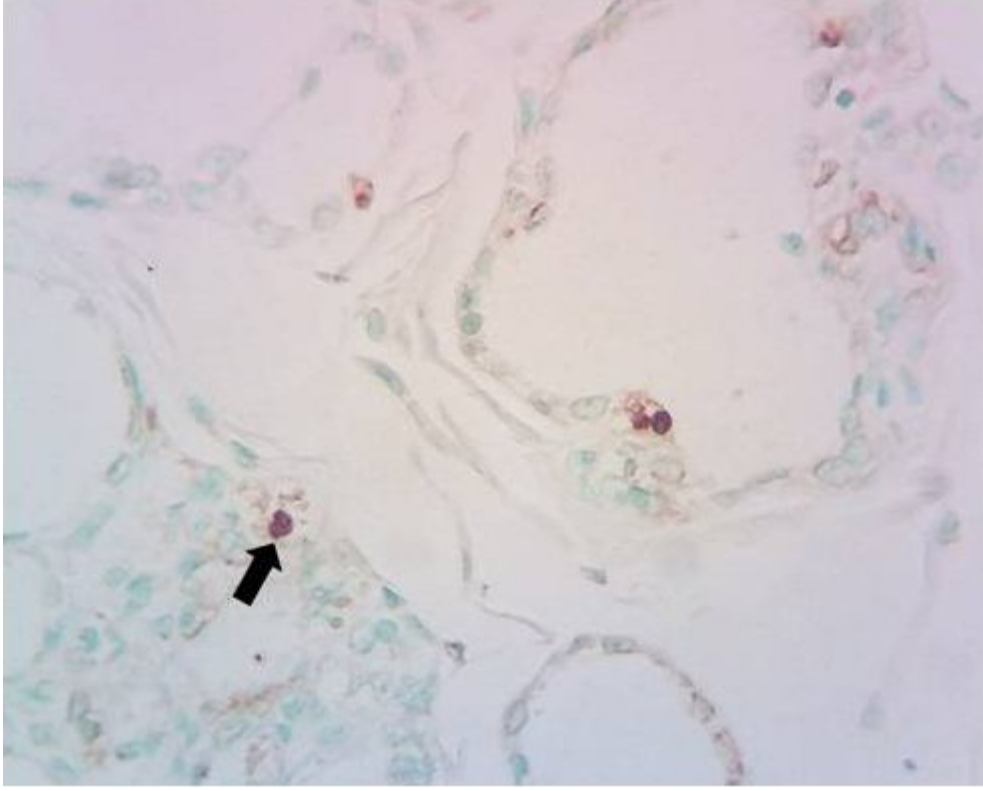
Şekil 6. Kontrol Grubunda Tunel + Hücreler



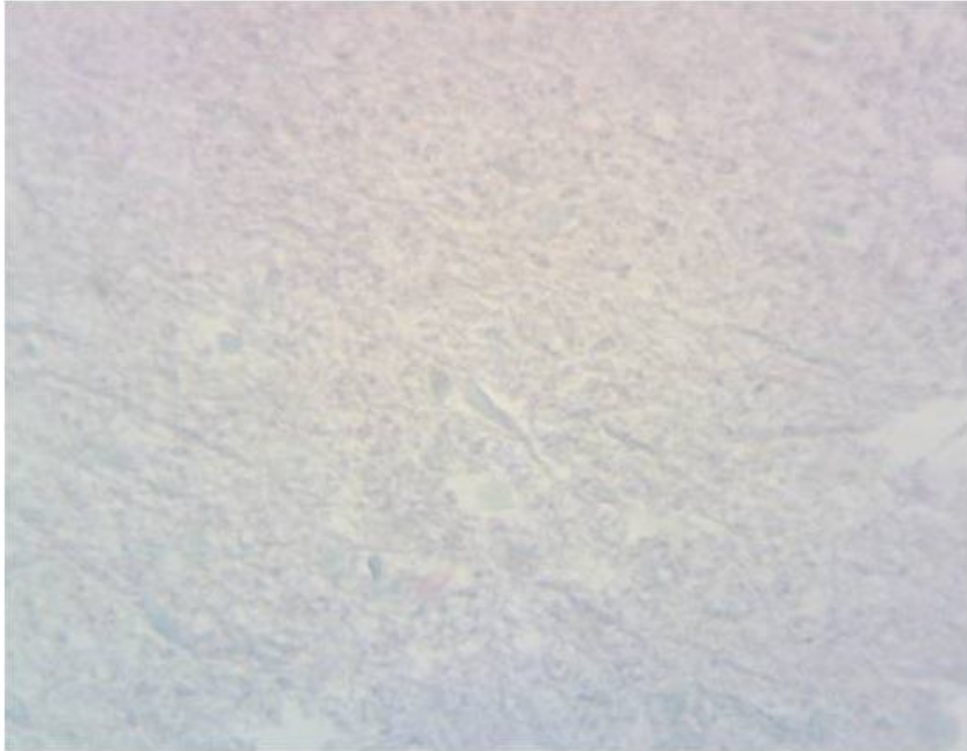
Şekil 7. İskemi grubunda artmış Tunel + hücreler



Şekil 8. Bosentan grubunda Tunel + hücreler



Şekil 9. Pozitif kontrol için meme dokusu



Şekil 10. Negatif kontrol

3.2. TAS, TOS VE OSI değerleri

Beyin dokularında TAS ve TOS miktarları ve OSI nin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; gruplar arasında TAS için anlamlılık yoktu. TOS miktarında Grup II’de, Grup I ile kıyaslandığında anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). Grup III’de ise Grup II ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$). OSI değerlerinde benzer şekilde Grup II’de, Grup I ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Grup III’de ise Grup II ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Beyin dokularındaki TAS, TOS ve OSI değerleri

	Grup I (n=7)	Grup II (n=7)	Grup III (n=7)
TAS ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent/l)	0,33 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02
TOS (mmol H2O2 equivalent/l)	1,86 $\pm$ 0,06	4,72 $\pm$ 0,25 ^a	3,17 $\pm$ 0,12 ^b
OSI (Arbitrary Unit)	5,74 $\pm$ 0,31	12,10 $\pm$ 0,42 ^a	8,56 $\pm$ 0,26 ^b

^a Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

^b İskemi grubuna (Grup II) göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

4. TARTIŞMA

İnme ölüm sebepleri içerisinde üçüncü ve sakatlık yönünden de birinci sırada olan hastalık grubudur (2). Bu grubun % 80-85'ini oluşturan iskemik inme nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan gruptur (2). İskemik inme, mortalitesinin yanı sıra oluşturduğu sakatlıklar nedeniyle kişi, aile ve toplum üzerinde psikososyal problemlere yol açar (2). Bu nedenle ekonomik yönden de yük teşkil etmektedir. SVH'ların önlenmesi ve tedavisi, bu yönleriyle çok önemli bir halk sağlığı sorunudur (2). İskemik inme tedavisinde amaç, nörolojik hasarlanmayı en aza indirmek, iskemiye ikincil oluşabilecek ek hasarları engellemek ve hastanın fonksiyonel iyileşmesini kolaylaştırabilecek önlemleri almak olmalıdır (25). Bugün için, akut iskemik inmede yararı kanıtlanmış tek tedavi rekombinan doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) ile ilk 3 saatte yapılan intravenöz trombolitik tedavidir (109).

Ülkemizde trombolitik tedavi çok az merkezde uygulanmaktadır ve inme ünitelerinin sayısı da çok azdır. Gelişmekte olan ülkelerde, ilacın pahalı olması ve altyapı yetersizlikleri tedavinin yaygınlaşmasında en önemli bariyeri oluşturmaktadır (110). Trombolitik tedavinin uygulanmasındaki yetersizlikler nedeniyle iskemik inme tedavisinde farklı ajanlarla çalışmalar devam etmektedir.

Bu amaçla deneysel iskemi modelleri oluşturulmuş ve çeşitli ajanlarla koruyucu ve tedavi edici çalışmalar yapılmıştır (111, 112). Yapılan çalışmalarda serebral iskemi-reperfüzyon modeli oluşturmak için sıklıkla iki taraflı arteria karotis kommunis ligasyonu ve orta serebral arter ligasyonu kullanılmaktadır (111, 112). Ancak çalışmamızda, tedavi amaçlı verilen bosentan uygulamalarının iskemi oluşturulduktan sonra 5 gün süre ile verilmesinin planlanması ve deneklerin bu süre boyunca yaşamını devam ettirmesi gerektiğinden tek taraflı karotis arter ligasyonu tercih edildi.

İskemi/reperfüzyon hasarı yetersiz oksijen sunumu ile başlayan, serbest oksijen radikallerinin ve immun sistemin rol aldığı ikincil inflamatuvar yanıtla genişleyen, karmaşık bir süreçtir. Dokunun hipoperfüzyonu ile oluşan durum ekstremité iskemisi, serebrovasküler olay ve miyokard infarktüsüdür. Bunlar değişik dokularda farklı klinik sonuçlarla ortaya çıkar. Bu farklı durumlarda oluşan hücresel düzeydeki patolojik süreçlerin evreleri benzerdir (65, 66). İskemi/reperfüzyonun yol

açtığı doku hasarının büyük kısmı reperfüzyon aşamasında oluşur. Doku hasarının oluşumunda reperfüze dokularda biriken nötrofillerin aktif rol oynadığını gösteren birçok kanıt mevcuttur. Nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin başlatılmasında serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksitlerin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (69).

Serebral iskemik dokuda oluşan biyokimyasal kaskadın birçok kademeleri vardır. Yapılan çalışmalar nöron ölümüne yol açan başlıca dört fazın olduğunu ve bu fazlarda rol oynayan majör mediatörlerin intrasellüler sitozolik kalsiyumun kontrolsüz yükselişi, serbest radikallerin artışı ve asidoz olduğu gösterilmiştir (14, 32).

İntrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun artışı durumunda normal fizyolojik yolların aşırı stimülasyonu ile nöronal hasar oluşur. İntrasellüler kalsiyumun artışı nöron içinde kalsiyuma bağlı birçok enzimin aktive olmasına neden olur. Bu enzimler protein-kinaz-C, Protein-kinaz-II, fosfolipaz-A2, proteaz, protein fosfotaz, nitrik oksit sentetaz (NOS), endonükleaz ornitin dekarboksilaz ve ksantin oksidaz'dır. Kalsiyuma bağlı bu enzimlerin aktivasyonu serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu ve protein yıkımına neden olarak nöronun harabiyetine yol açarlar (14, 18, 32, 46, 47).

Hücre içi kalsiyum artışı ve serbest radikallerin artışı apoptoza yol açan uyarılardandır. Bu durum spesifik gen transkripsiyonları ve protein sentezine neden olur (14, 18, 32, 62, 63). İskemik inme başlangıcından itibaren multiple mekanizmanın beyin hasarına katkısı bilinmektedir.

Bunlar, serbest radikal üretimi, eksitotoksisite, sodyum ve kalsiyum akışı bozulması, enzimatik değişiklikler, inflamatuvar süreç uyarılması, trombosit ve lökositlerin aktivasyonu, gecikmiş koagülasyon, endotelial disfonksiyon ve endotelin (ET) salınımını içerir (3-5).

Bosentan endotelin reseptörlerinden olan ETA ve ETB'nin kompetitif antagonistidir. Günümüzde halen primer (idiyopatik ve ailesel) pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmaktadır (11, 12).

Son zamanlarda bosentanin invitro olarak serebral vazospazm üzerine etkileri ile ilgili yayınlar görülmektedir (13).

Patel ve arkadaşları geçici global iskemi modelinde bosentanin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bosentanin postiskemik hipoperfüzyon oluşturulmuş ratlarda

kaudat nükleus ve pariyetal kortekste serebral kan akımı değişikliği yaptığını tespit etmişlerdir (104).

Bu çalışmamızda ET reseptör antagonisti olan bosentanın, deneysel iskemik model oluşturulan sıçan beyin dokusunda iskemiye karşı oluşan etkilerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, ilk olarak tüm gruplara ait beyin dokularında TAS, TOS ve OSI değerlerine bakıldı. Tüm gruplarda TAS değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmezken TOS düzeylerinde ve OSI de anlamlı değişiklikler gözlemlendi. İskemi oluşturulan sıçanların beyin dokularında TOS düzeyleri kontrolle kıyaslandığında anlamlı şekilde artmıştı. Bosentan verilen grupta ise TOS düzeyleri kontrole yakındı. OSI ise iskemik grupta artarken bosentan verilen grupta kontrole yakındı.

TOS'u meydana getiren temel komponentler hidrojen peroksid ve lipid hidroperoksittir (113).

Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen ürünlerin tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu malondialdehid oluşur (113,114). İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonu veya eikozoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağıdır. MDA'nın belirlenen seviyeleri serbest radikallerin oluşturduğu zararlar hakkında bilgi edinilmesini sağlar (113,114).

Gupta YK ve ark. (115) yaptıkları çalışmalarında çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde oksidatif hasarın arttığını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmalarında MCA oklüzyonu oluşturulmuş sıçanlarda malondialdehit düzeylerinde anlamlı bir artış tespit etmişler. Bu tespitleriyle MCA oklüzyonu oluşturulmuş sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı oksidatif hasar oluştuğunu göstermişlerdir.

Sugawara T ve ark. (116) da benzer şekilde deneysel iskemide Hidrojen peroksid ve lipid hidroperoksitin arttığını göstermişlerdir.

MSS'nde iskemik ve hemorajik inme dahil olmak üzere birçok nöronal yaralanmada, ET sisteminin rolleri bildirilmiştir (117, 118).

Simonson MS ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Endotelinlerin ETA ve ETB reseptörlerine bağlanması sonucu hücre içi sinyal sistemlerinin harekete geçtiğini ve bunlar arasında G proteinleri uyarımı sonucu fosfolipaz C aktivasyonu inositol fosfat ve diaçilgliserol salınım ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum düzeylerinin yükseldiğini göstermişlerdir (9).

Rauh ve ark. (119) ET1 modülasyon ve ET1 kaynaklı çeşitli sinyalizasyon yollarının aktivasyonu sonucu serbest oksijen radikalleri oluştuğu gösterilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda Artmış ET1 seviyelerinin inflamatuvar süreçler, ateroskleroz ve hipertansiyonda aşırı NO ve ONOO-peroxynitrite üretimine sebep olduğu ve antioksidan bir azalma meydana getirdiği gösterilmiştir (120-122).

Karotis arter oklüzyonu modeli ile geçici ön beyin iskemisi oluşturulmuş bir çalışmada ET-1 düzeyleri yükselmiş bulunmuş ve bunun da iskemi / reperfüzyon hasarı patogenezinde ET-1 reseptörünün katılımıyla olduğu ileri sürülmüştür (123).

Çalışmamızdaki bosentan verdiğimiz gruptaki azalmış TOS değerleri yukarıda belirtilen birçok çalışmada bildiridiği gibi bosentanin direk veya dolaylı olarak antioksidatif etkisi olabilir.

Çalışmamızda apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan TUNEL boyamasının sonucunda; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İskemi grubunda TUNEL pozitif hücrelerde belirgin bir artış gözlenirken BOSENTAN verilen tedavi grubunda İskemi grubuna göre belirgin azaldığı ve kontrol grubuna yakın olduğu izlendi

Oksidatif strese kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişir. Bu değişiklik mitokondriumlarda ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi programlı ölüme yani apoptozise sürükler (124).

Serbest oksijen radikalleri doğrudan oluşan nöron hasarının dışında hücre içinde apoptotik süreci ve ekzitotoksik nöron hasarını başlatan yolları aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Apoptotik nöron ölümü in vitro ve invivo global-fokal iskemi/reperfüzyon modellerinde çalışılmıştır (72).

Yakın zamanda adenosin, melatonin, resveratrol, alfa-tokoferol gibi antioksidan ajanların sıçanlarda akut iskemik inme MCA oklüzyon modelinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (125, 127-129)

Riad A ve ark. (126) yaptıkları çalışmada artmış ET1 düzeyinin, artmış kalp lipid peroksidasyonu ve artmış TNF α aracılığıyla kardiyak oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir.

Endotelin antagonistlerinin güçlü vazodilatör etkisi vardır ve yakın zamanda antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (10).

Özdemir ve ark.(130) tarafından yapılan çalışmada ET1 ile ilişkili artmış CAT, redükte glutatyon ve SOD düzeyleri ETA reseptör antagonisti (BQ 123) ile tedavi verilen grupta artmış olan bu serbest oksijen radikallerinin azalmış düzeyleri ile antioksidan özelliği gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki bosentan verdiğimiz tedavi grubunda azalmış TUNEL pozitif hücrelerin gözlenmesi bosentanın oksidatif hasarı farklı yollarla azaltmasına bağlı olabilir.

Sonuç olarak;

İskeminin oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir. İskemik inme başlangıcından itibaren multiple mekanizmanın beyin hasarına katkısı olduğu düşünülmüştür. Artmış ET düzeyinin oksidatif stres ve apoptozisi arttırdığı, ET reseptör antagonistlerinin oksidatif stres ve apoptozisi azalttığı daha önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur. Güçlü bir ET reseptör antagonisti olan bosentanın beyin dokusunda oksidatif stres ve apoptozisi azalttığı tespit edilmiştir.

İskeminin oluşturduğu hücre hasarına karşı bosentanın koruyucu etkilerinin olmasının gösterilmesi iskeminin tedavi ve komplikasyonları açısından ele alındığında önemli bir bakış açısı kazandırabileceği düşünülmüştür.

Çalışmadaki bulgularımızın teyid edilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu, gelecekte ayrıntılı çalışmalarla iskemi komplikasyonlarını önlemek amacıyla bosentan ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının denenebileceği kanaatindeyiz.

5. KAYNAKLAR

1. Hatano S. Experience from a multicenter stroke register: a preliminary report. Bull World Health Organ 1999; 54: 541-553.
2. Weinberger J. Stroke. 2nd, Pennsylvania: Handbooks in Health Care Co, 2002: 1-80.
3. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; mechanisms of damage and treatment. Age Ageing 1992; 77: 337-354.
4. Scott JF, Gray CS. Cerebral and systemic pathophysiological responses to acute stroke. Age and Ageing 2000; 29: 197-202.
5. Cheung RT. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. J Pineal Res 2003; 34: 153-160
6. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonist: Roles in cardiovascular health and disease. Am Heart J 1995; 130: 601-610.
7. Hirata Y. Endothelin peptides. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 1996; 5: 12-15.
8. Stevenson LW, Fonarow GC. Endothelin and the vascular choir in heart failure. JACC 1992; 20: 854-7.
9. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Bunn MT. Endothelin-1 activates the phosphoinositide cascade in cultured glomerular mesangial cells. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 13: 580-583.
10. Andrasi TB, Kekesi V, Blazovics A, Dobi I, Szabo G, Juhasz-Nagy A. ET(A) receptor blockade protects the small intestine against ischaemia/reperfusion injury in dogs via an enhancement of antioxidant defences. Clinical Sci 2002; 148: 59-63.
11. The task force on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension of the European Society of Cardiology. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. Eur Heart J. 2004; 25: 2243-2278.
12. Rubin LJ. Introduction: Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines: Chest 2004; 126: 7S-10S

13. Shigeno, Taku. Clozel, Martine. Sakai, Satoshi, Saito, Akira, Goto, Katsutoshi The Effect of Bosentan, a New Potent Endothelin Receptor Antagonist, on the Pathogenesis of Cerebral Vasospasm. 1995; 37: 87-91
14. Oğul E. Beyin Damar Hastalıkları. Klinik Nöroloji. 1.Baskı, İstanbul: Motif Basım, 2002: 1-28.
15. Victor M. Ropper AH. Cerebrovascular Diseases. Adams and Victor's Principles of Neurology. Seventh Edition. Newyork: McGraw-Hill. 2001: 821-924.
16. Rowland LP. Vascular Diseases. Merritt's Neurology. Tenth Edition, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 2000: 217-256.
17. Balkan S. Serebrovasküler Hastalıklar. 1.Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2002: 3-31.
18. Kumral E. Akut İskemik İnme. İstanbul: Akal ofset, 2001: 1-68.
19. Zivin JA. Factors determining the therapeutic window for stroke. Neurology, 1988: 599-603.
20. Heiss WD, Theil A, Grond M, Graf R. Which targets are relevant for therapy of acute ischemic stroke? Stroke 1999; 30: 1486-9.
21. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, et al. Intra arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The Proact II study: a randomized controlled trial. Prilyse in Acute Cerebral Thromboembolism. JAMA 1999; 282: 2003-11.
22. Dell Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. Stroke 1998; 29: 4-11.
23. Fieschi C, Lenzi GL, Sacchetti ML, Toni D, Bozzao L. Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. J Neurol Sci 1989; 91: 311-21.
24. Wolpert SM, Bruckmann H, Greenlee R, Wechsler L, Pessin MS, del Zoppo GJ. Neuroradiologic evaluation of patients with acute stroke treated with recombinant tissue

- plasminogen activator. The rt-PA Acute stroke Study Group. Am J Neuroradiol 1993; 14: 3-13.
25. Sarıbaş O, Topçuoğlu MA, Arsava EM. Akut İskemik İnmelelerde Tedavi Yaklaşımları. Balkan S (edt). Serebrovasküler Hastalıklar. Antalya: Güneş Kitapevi, 2005: 289-311.
 26. Bonita R, Steward A, Beaglehole R: İnternational trends in stroke mortality: 1970-1985. Stroke 1990; 21: 989-992.
 27. Shinkawa A, Ueda K, Hasuo Y, Kiyohara Y, Fujishima M. Seasonal variation in stroke incidence in Hisayama, Japan. Stroke 1990; 21: 1262-1267.
 28. Biler J. Love BB. İschemic Cerebrovascular Disease. Bradley WG. Daroff RB. Fenichel GM. Marsden CD.(eds) Neurology in Clinical Practice. Third Edition. Boston: Butterwort-Heinemann, 2000: 1125-1166.
 29. Kumral K. Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1993:1-68.
 30. Bogousslavsky J, Van Mele G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: Analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. Stroke 1998; 19: 1083-1092.
 31. Kumral E, Özkaya B, Sağduyu A, Şirin H, Vardarlı E, Pehlivan M. The Ege Stroke Registry. A hospital based study in the Aegian Region, İzmir: Analysis of 2000 patients. Cerebrovascular Diseases 1998; 8: 278-288.
 32. Warlov CP, Dennis MS, Van Gijn J, Sandercock PAG, Bamford JM, Wardlow JM. STROKE: A Pratical Guide to Management. Second Edition. Oxford: Blackwell Science, 2001:1-50.
 33. Cerebral Embolism Study Group. İmmediate anticoagulation of embolic stroke: a randomized trial. Stroke 1983; 14: 668-676.
 34. Kittner SJ, Sharkness CM, Price TR, Plotnick GD, Dambrosia JM, Wolf PA, et al. Infarcts with a cardiac source of embolism in the NINCDS Stroke Data Bank: historical features. Neurology 1990; 40: 281-284.

35. Colditz GA, Bonita R, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Cigarette smoking and risk of stroke in middle-aged women. *N Engl J Med* 1988; 318: 937-941.
36. Shinton R, Beevers G. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ* 1989; 298: 789-794.
37. Welch GN, Loscalzo J. Mechanisms of disease: homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-1050.
38. Bushnell CD, Goldstein LB. Homocysteine testing in patients with acute ischemic stroke. *Neurology* 2002; 59: 1541-1546.
39. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-13.
40. Verhoef P, Hennekens CH, Malinow MR, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ. A prospective study of plasma homocysteine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1924-1930.
41. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ. Inflammation, aspirin and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997; 336: 973-979.
42. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Choop M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 1993; 142: 623-635.
43. Kutluk K. İskemik inme: Patogenez. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2004: 19-35.
44. Touzani O, Young AR. Progressive impairment of brain oxidative metabolism reversed by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in anaesthetized baboons. *Brain Res* 1997; 767: 17-25.
45. Stys PK, Waxman SG, Ranson BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 1992; 12: 430-439.
46. Zipfel GJ, Lee JM, Choi DW. Reducing calcium overload in the ischemic brain. *N Engl J Med* 1999; 341: 1543-4.

47. Choi DW. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neuro Sci* 1995; 18: 58-60.
48. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
49. Phillis JW. A "radical" view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994; 42: 441-448.
50. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1185-95.
51. Yemişçi M, Gürer Günfer, Dalkara T. İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar. *Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi* 2004; 2: 22-31.
52. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36: 557-565.
53. Nedergaard M Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 1996; 71: 75-83.
54. Takano K, Latour LL, Formato JE, Carano RA, Hemler KG, Hasegawa Y, Sotak CH, Fisher M. The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Ann Neurol* 1996; 39: 308-318.
55. Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasculer Brain Metab Rev* 1996; 8: 195-208.
56. Busch E, Gyngell ML, Eis M, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. Potassium-induced cortical spreading depressions during focal cerebral ischemia in rats: contribution to lesion growth assessed by diffusion-weighted NMR and biochemical imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1090-1099.
57. Otsuka H, Ueda K, Heimann A, Kempinski O. Effects of cortical spreading depression on cortical blood flow, impedance, DC potential, and infarct size in a rat venous infarct model. *Exp Neurol* 2000; 162: 201-214.
58. Revett K, Rupin E, Goodall S, Reggia JA. Spreading depression in focal ischemia: a computational study. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 998-1007.

59. Strong Aj, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M. Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* 2002; 33: 2738-2743.
60. Bredesen DE. Neural apoptosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 839-51.
61. Kuschinsky W, Gillardon F. Apoptosis and cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10: 165-169.
62. Isenmann S, Stoll G, Schroeter M, Krajewski S, Reed JC, Bahr M. Differential regulation of bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat. *Brain Pathol* 1998; 8: 49-62.
63. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neuro Sci* 1998 15; 18: 3659-3668.
64. Ma J, Endres M, Moskowitz MA. Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 756-762.
65. Neblina FL, Toledo AH, Pereyna LHT. Molecular biology of apoptosis in ischemia reperfusion. *J Invest Surg.* 2005; 18: 335-350.
66. Su-Lan L, Wen-Yin C, Shue-Ling R, Jon-Son K, Chun-Jung C. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Molecular Neuro Sci* 2001; 12: 1943-1947.
67. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Whan G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 2004; 1: 17-25.
68. Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Möllenberg, Mielke L, Kochs E. Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete global ischemia in rats. *Br J Anaesth.* 1999; 83: 415-421.
69. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 38: 1433–1444.

70. DeGracia DJ, Kumar R, Owen C, Krause G, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 127-141.
71. Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998; 141: 1423-32.
72. Christophe M, Niolas S. Mitochondria: A target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia/reperfusion. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12: 739-757.
73. Xiong Li-ze. Neuroanesthesia and neuroprotection: where are we now? *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 883-886.
74. Sanders R, Daqing Ma, Maze M. Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Prac Res Clinic Anaesthes* 2005; 1: 461-47.
75. Hans P, Bonhomme V. The rational for perioperative brain protection. *EJA* 2004; 21: 1-5.
76. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
77. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1341-1348.
78. Şahin M, Alp N. Endotelinin klinik kardiyojide yeri ve önemi. *MN Kardiyoloji* 1995; 2: 73-6.
79. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985; 248: 550-6.
80. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
81. Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafatoxin a novel vasoconstrictor peptide: Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 1988; 242: 268-272

82. Kramer BK, Nishida M, Kelly RA, Smith TW. Endothelins: myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation* 1992; 85: 350-354.
83. Kusumoto K, Awane Y, Fujiwara S, Watanabe T. Role of endogenous endothelin in extension of rabbit myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 5339-5342.
84. Ferri C, Laurenti O, Bellini C, Faldetta MRC, Properzi G, et al. Circulating endothelin-1 level in lean non-insulin-dependent diabetic patients. *AJH* 1995; 8: 40-47.
85. Kiowski W, Lüscher TF, Linder L, Bühler FR. Endothelin-1 induced vasoconstriction in humans. *Circulation* 1991; 83: 469-75.
86. Cry C, Kris RM. Desensitization of human endothelin-A receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 511-514.
87. Warner TD, Schmidt HW, Murad F. Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cell: Selective effects of endothelin-3. *Am J Physiol* 1992; 262: 1600-1605.
88. Gültekin N, Yıldırım A, Özbayrakçı S, Küçüköğlu S, Mutlu H. Endothelin sistemi. *T Klin Kardioloji* 1994; 7: 234-8.
89. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 1995; 91: 941-947.
90. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989; 83: 1762-1767.
91. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990; 344: 114-116.
92. Plumpton C, Champeney R, Ashby MS, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: Endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 26-28.
93. Richard V, Hogie M, Clozel M, Löffler BM, Thuillez C. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 1995; 91: 771-775.

94. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113: 981-986.
95. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732
96. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732-735
97. Randall MD, Douglas SA, Hiley CR. Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 685-699
98. Harrison VJ, Randrianisoa A, Schoeffter P. Heterogeneity of endothelin-sarafotoxin receptors mediating contraction of pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 511-513
99. Clozel M, Gray GA, Breu V, Löffler BM, Osterwalder R. The endothelin ET_B receptor mediates both vasodilatation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 867-873.
100. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler BM, Burri K, Cassal JM, Hirth G, Müller M, Neidhart W, Ramuz H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Experiment Therapeutics* 1994; 270: 228-235.
101. Miller RC, Pelton JT, Huggins JP. Endothelins-from receptors to medicine. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 54-60.
102. Ihara M, Fukuroda T, Saeki T, Nishikibe M, Kojiri K, Suda H, Yano M. An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 132-137.
103. Hiley CR, Cowley DJ, Pelton JT, Hargreaves AC. BQ-123, cyclo(-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu), is a non-competitive antagonist of the actions of endothelin-1 in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 504-510.
104. Patel TR, McCulloch J. Postischemic hypoperfusion in transient global ischemia: a role for endothelins *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 425-428.

105. Moira A. McAuley, Volker Breu, David I. Graham and James McCulloch The effects of bosentan on cerebral blood flow and histopathology following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Euro J Pharmacology* 1996; 307: 171-181.
106. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112–119.
107. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103–1111
108. Demirbag R, Yilmaz R, Erel O, Gultekin U, Asci D, Elbasan Z. The relationship between potency of oxidative stress and severity of dilated cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 2005; 21: 851-855.
109. The National Institute of Neurological Disorders rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581-1587.
110. Kürşad Kutluk. Akut iskemik inmede intravenöz trombolitik tedavi: Sorumluluğumuzun farkında mıyız? *Türk Serbrovasküler Hastalıklar Dergisi* 2009; 15: 35-39.
111. Rabuffetti M, Scioratti C, Tarozzo G. Inhibition of Caspase-1-Like activity by Ac-Tyr-Ala-Asp-Cholromethyl Ketone Induces Long-Lasting Neuroprotection in cerebral Ischemia through Apoptosis Reduction and Decrease of Proinflammatory Cytokines. *J Neurosci* 2000; 20: 4398-4404
112. Simon L, Szilagyi G, Bori Z. (-)-D-Deprenyl attenuates apoptosis in experimental brain ischaemia. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 235–241.
113. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. İstanbul: Mimoza Yayınları, 1995:1-85.
114. Bekereccioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest Radikaller. *Sendrom* 1998; 10: 85-95.
115. Gupta YK, Briyal S, Sharma U, Jagannathan NR, Gulati A. Effect of endothelin antagonist (TAK-044) on cerebral ischemic volume, oxidative stress markers and neurobehavioral parameters in the middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 2005; 77: 15-27.

116. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Whan G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 2004; 1: 17-25
117. Barone FC, White RF, Elliott JD, Feuerstein GZ, Ohlstein EH. The endothelin receptor antagonist SB 217242 reduces cerebral focal ischemic brain injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 404–407.
118. Barone FC, White RN, Yue TL, Feuerstein GZ. Therapeutic effects of endothelin receptor antagonist in stroke. *Neuro Res* 1995; 17: 259–264.
119. Rauh A, Windischhofer W, Kovacevic A, DeVaney T, Huber E, Semlitsch M, Leis HJ: Endothelin (ET)-1 and ET-3 promote expression of c-fos and c-jun in human choriocarcinoma via ET(B) receptor-mediated G(i)- and G(q)-pathways and MAP kinase activation. *Br J Pharmacol* 2008; 154: 13–24
120. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003; 42: 316–321.
121. Skalska AB, Pietrzycka A, Stępniewski M. Correlation of endothelin 1 plasma levels with plasma antioxidant capacity in elderly patients treated for hypertension. *Clin Biochem* 2008; 42: 358–364.
122. Teplyakov A. Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 274–275.
123. Willette RN, Ohlstein EH, Pullen M, Sauermelch CF, Cohen A, Nambi P. Transient forebrain ischemia alters acutely endothelin receptor density and immunoreactivity in gerbil brain. *Life Sci* 1993; 52: 35–40
124. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaslanma. *Cerrahpasa J Med* 2004; 35: 159-169
125. Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sciences* 2002; 28: 655–665

126. Riad A, Bien S, Gratz M, Escher F, Westermann D, Heimesaat MM, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Heart Fail* 2008; 10: 233–243
127. Sinha K, Deogonakar M, Jagannathan NR, Gupta YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 428: 185–192.
128. Gupta YK, Sinha K, Chaudhary G, Jagannathan NR, Protective effect of adenosine against neuronal injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats as evident by diffusion weighted imaging. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 569–574.
129. Chaudhary G, Sinha K, Gupta YK. Protective effect of exogenous administration of α-tocopherol in middle cerebral artery occlusion model of cerebral ischemia in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 703–707.
130. Ozdemir R, Parlakpınar H, Polat A, Colak C, Ermis N, Acet A. Selective endothelin A (ETA) receptor antagonist (BQ 123) reduces both myocardial infarct size and oxidant injury. *Toxicology* 2006; 219:142–149.

6. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2006 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2006 Eylül Tıpta Uzmanlık Sınavıyla Fırat Üniversitesi Anatomi ABD'nda araştırma görevlisi olarak çalıştım. 2007 Nisan'da Tıpta Uzmanlık Sınavıyla başladığım Fırat Üniversitesi Nöroloji ABD'da ki uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim. Orta derecede İngilizce bilmekteyim.