

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA KAROTİS ARTER OKLÜZYONU İLE OLUŞTURULAN
İSKEMİ VE REPERFÜZYON MODELİNDE PREGABALİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

Dr. Sanem AŞCI

NÖROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ

ISPARTA 2011

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Süleyman KUTLUHAN, Doç. Dr. Hasan Rıfat KOYUNCUOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ'ye, laboratuvar çalışmaları kapsamında biyokimyasal değerlendirme için Yrd. Doç. Dr. Duygu Kumbul DOĞUÇ'a, istatistik analizlerinin yapılmasında katkıda bulunan Yrd. Dr. Esin KULAÇ'a kıymetli zamanlarını ayırdıkları için teşekkür ederim.

Deneylerin yapılması sırasında beni destekleyen Öğr. Gör. İbrahim ONARAN'a, Farmakoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Dr. Mehtap SAVRAN ve Arş. Gör. Şükriye YEŞİLOT'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Arş. Gör. Aydın CANDAN 'a teşekkürü bir borç biliyorum

Tüm bu tez aşamaları sürerken her an benim yanımda olan sevgili eşim Uzm. Dr. Halil AŞCI'ya da çok teşekkür ederim.

Dr. Sanem AŞCI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER, TABLOLAR, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR	3
2.1.1. Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Etyoloji ve Sınıflandırma.....	4
2.1.3. İnme Risk Faktörleri	7
2.1.4. Fizyopatoloji	15
2.1.5. Serebral İskemide Tedavi.....	23
2.2. NİTRİK OKSİT	28
2.3. ANTİOKSİDAN SİSTEM	29
2.4. LİPID PEROKSİDASYONU.....	31
2.5. NMDA RESEPTÖRLERİ.....	31
2.6. PREGABALIN	32
3. MATERYAL-METOD	34
3.1. HİPOKAMPÜS VE FRONTAL LOB ÖRNEKLERİNİN HOMOJENİZASYONU.....	35
3.2. SDS-PAGE YÖNTEMİ.....	36
3.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ	36
3.4. SUPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD).....	37
3.5. GLUTATYON PEROKSİDAZ.....	37
3.6. KATALAZ (KAT).....	37
3.7. TIYOBARBİTÜRİK ASİD REAKTİF ÜRÜNÜ (TBARS).....	38

3.8. NİTRAT/ NİTRİT ÖLÇÜMÜ (NO).....	38
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	39
4.1.1. WESTERN BLOT BANTLARI	39
4.1.2. OKSİDATİF STRES ÜRÜNLERİ	40
4.1.3. NMDA RESEPTÖR DÜZEYLERİ.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
ÖZET.....,	51
SUMMARY.....	53
KAYNAKLAR.....	55

SİMGE VE KISALTMALAR

AF	Atriyal Fibrilasyon
AST	Aspartat Transaminaz
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca	Karsinom
CRP	C-Reaktif Protein
DM	Diyabetes Mellitus
GABA	Gama Amino Butirik Asid
GİA	Geçici İskemik Atak
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
H.E.	Hemotoksilen Eosin
HT	Hipertansiyon
INR	İnternational Normalised Ratio
İNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
İSK	İntraserebral Kanama
KAT	Katalaz
KC	Karaciğer
MDA	Malondialdehid
MI	Miyokard İnfarktüsü
MMP	Metalloproteinaz
MR-A	Manyetik Rezonans- Anjio
NMDA	N-Metil D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
PFO	Patent Foramen Ovale
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SAK	Subaraknoid Kanama
SOD	Süperoksid Dismutaz
SSS	Santral Sinir Sistem
SVO	Serebrovasküler Olay

VSKK	Voltaj Sensitif Kalsiyum Kanalları
------	------------------------------------

ŞEKİLLER, TABLOLAR, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Nöropatogenezde rol alan mekanizmalar	16
Şekil 2. Serbest radikallerin oluşumu ve detoksifikasyonu	18
Şekil 3. İskemik kaskad mekanizmalarına etki eden nöroprotektif ajanlar	26
Şekil 4. Antioksidan enzim olan SOD ve GSH-Px'in etki mekanizmaları	30
Şekil 5. GABA ve Pregabalin'in moleküler yapısı	32
Şekil 6. Western Blot Yöntemi ile elde edilen β -aktin bant yoğunlukları	36
Şekil 7. NR2A ve NR2B reseptörüne ait bant.....	40
Şekil 8. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen TBARS düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	41
Şekil 9. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NO düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	42
Şekil 10 Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen GSH-Px düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	42
Şekil 11. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen SOD düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	43
Şekil 12. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen KAT düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	43
Şekil 13. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NR2A reseptör düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	44
Şekil 14. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NR2B reseptör düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	45

TABLÖLAR

Tablo 1: İskemik inmede TOAST sınıflandırması	4
Tablo 2: İskemik inme alt gruplarının standartize sendromik sınıflaması	5
Tablo 3: İnme Risk Faktörleri	7
Tablo 4: Deney gruplarının sınıflandırılması.....	34
Tablo 5: Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusu frontal lobu Oksidatif Stres Parametreleri	40
Tablo 6: Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusunun frontal lobundan ölçülen NR2A ve NR2B reseptör düzeylerinin aritmetik ortalaması	44

RESİMLER

Resim 1: Deney sırasında uygulanan sağ internal karotis arter oklüzyon aşamaları.	36
------------------------------------------------------------------------------------------	----

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebrovasküler olay (SVO) nöral dokunun frajil, zararlanmaya açık, kompleks ve rejenerasyon kapasitesinin düşük olması nedeniyle, büyük oranda geri dönüşsüz ve tedavi maliyeti yüksek defisitlere yol açan bir hastalıktır (1).

İnme sırasında kan akımının kesilmesi nedeniyle beslenme alanının merkezindeki yoğun iskemi bölgesi 7–9 dakika içerisinde geri dönüşsüz hasara uğramakta, perifer ise kollateral akım sayesinde yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü koruyabilmektedir. Bu iki alan arasında ise ‘penumbra’ adı verilen yapısal bütünlüğünü koruyabilecek kadar kanlanan ancak nöral elektrik aktiviteyi sürdürebilecek oksijen ve besinden mahrum bir ‘geçiş bölgesi’ bulunmaktadır. SVO hastasının ilk muayenesinde saptanan defisitlerin bir kısmından sorumlu ancak gerekli şartlar sağlanabildiği takdirde normal fonksiyonuna kavuşabilecek olan penumbranın kurtarılması, son yıllardaki akut dönem tedavi yaklaşımlarının temel hedefini oluşturmaktadır (1). Ancak iskemik dokunun normal fonksiyonunun tamiri için kritik olan reperfüzyon, paradoks olarak sekonder hasarlanmayla sonuçlanabilir (2). Reperfüzyon ile birlikte yeniden oksijen sağlanması, aşırı serbest radikal oluşumuna neden olur (3).

Serbest radikaller oksidatif metabolizma sırasında oluşur ve genelde iyi kontrol edilir. Bu kontrolde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) gibi önemli intrasellüler savunucu enzimler rol oynar (4). Endojen hücrel antioksidan mekanizmaları aşan serbest radikal üretiminde oksidatif stres gelişir. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünü ve ana göstergesidir (4). Nitrik oksit (NO) endotel kökenli, son derece hızlı ve kısa süreli etki eden, özellikle yüksek reaktiviteye sahip merkezi sinir sistemi yatağında olmak üzere tüm vasküler sistemde eksprese edilen bir vazodilatatör ajandır (1). Bu ajanın azalmasına neden olan durumlarda meydana gelen vazokonstriksiyonla, platelet ve lökosit agregasyonu ile ilişkili serbest oksijen radikallerinde artış serebral iskemiyi arttırabilir (2).

Bazı antiepileptik ilaçlar inme sonrası gelişen hücre ölümünü azaltabilecek

nöroprotektif etkilere sahiptir (5). Ratlarda yapılan bir çalışmada, pregabalinin spinal iskemide nöroprotektör olduğu gösterilmiştir (6). Pregabalin bir yapısal δ -aminobutirik asit (GABA) analogudur (7) ve postherpetik nevralji, diyabetik nöropati, yaygın anksiyete bozukluğu ve parsiyel epileptik nöbetlerde ek tedavide etkinliği gösterilmiş sentetik bir aminoasid bileşimidir. Potent ve selektif olarak hipereksite voltaj sensitif kalsiyum kanallarının (VSKK) alfa-2-delta subünitine bağlanır (8). Bu bağlanma sonucu VSKK'nın konformasyonu değişir ve sinir terminallerinde kalsiyum akışı azalır. Pregabalin sadece hipereksite nöronlardan eksitatör nörotransmitter salınımını düzenler ve normal fizyolojik duruma dönmelerini sağlar (9). Pregabalin ve gabapentinin epilepsi tedavisinde etki mekanizması benzerdir ancak pregabalin gabapentinden daha potent olarak VSKK'na bağlanır (10). Gabapentin, GABA'nın üçüncü karbon pozisyonunda alkil derivesi olan diğer bir antiepileptiktir. Gabapentinin sıçan hipoksik ve immobilizasyon stres modellerinde oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (11). Literatür taramasında pregabalinin beyinde oksidatif stres üzerine etkisiyle ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Biz deneysel olarak karotis arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde, frontal kortekste NO, SOD, KAT, MDA ve GSH-Px düzeylerini ölçerek pregabalinin oksidatif stres üzerine ve hipokampüste N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerini ölçerek eksitotoksititeye etkisini değerlendirmeyi planladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Serebrovasküler Hastalıklar

2.1.1. Epidemiyoloji

İnme dünya toplumlarında sakatlık ve özürlülük meydana getirmede birinci, ölüm nedenleri arasında ise üçüncü sıradadır. Endüstrileşmiş toplumlarda hastane başvurularında ve sağlık harcamalarında önemli bir yer tutar (12).

Dünya sağlık örgütü inmeyi; serebral işlevlerin hızla gelişen fokal veya global bozukluğuna bağlı klinik bulguların, 24 saat veya daha uzun sürmesi veya ölüm gelişmesi olarak tanımlamaktadır. İskemik inme en sık inme nedeni olup, hemorajik inme primer intraserebral kanama (İSK) ve subdural kanama (SAK) olarak ikiye ayrılabilir (12).

SVO epidemiyolojisini incelemede en geçerli verilerden bir tanesi belli bir zaman periyodunda, bir populasyonda ortaya çıkan yeni inme olguları verileridir (12). Yaşa özgü inme insidansının, dekad artışı ile progresif bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir. 45 yaş altı kişilerde inmenin oranı 0,1–0,3/1000 kişi/yıl; 75–84 yaş arası 12–20/1000 kişi/yıl olarak değişmektedir. Yaşın standardize edildiği insidans çalışmalarında iskemik inme insidansı 1000 insan /yıl için 3,4–5,2 primer intraserebral kanama için 0,3–1,2 ve subaraknoid kanama için 0,03–0,2 arası saptanmıştır (13).

İnme prevalansı, belirli bir zamandaki olguların total sayısını gösterir. Yaşla birlikte artar. Örneğin inmeli hastaların %75'i 65 yaş üzerindedir. Coğrafi değişiklikler de gösterebilir. Batı ülkelerinde inme prevalansı 8 /1000, Japonya'da 20/1000'dir. Ülkemizde ise sağlıklı veriler yoktur (12). Erkeklerde inme prevalansı 58,8- 92,6/1000 kişi olup, kadınlarda 32,2- 61,2/ 1000 kişidir (13).

Türk Beyin Damar Hastalıkları Derneği öncülüğünde, 1995-96 yıllarında, 3100 hastalık bir grupta gerçekleştirilen çok merkezli inme çalışmasında (MST) ülkemizde %72 iskemik inme, %28 hemorajik inme saptanmıştır (13). Genel populasyonda yapılan çalışmalarda, iskemik inme tüm inmelerin %80-90'ını oluşturmaktadır.

İntraserebral kanamalar %5–10 sıklıktadır. İskemik inmelerde aterosklerozun rolü %27–43 arasındadır. Kardiyak kökenli inmelerin frekansı ise %22–33 arasındadır. Laküner infarktların insidansı %13–20 arasında değişmektedir (12).

2.1.2.Etiyoloji ve Sınıflandırma

İnme sınıflandırmalarında çeşitli toplumlarda bazı alt gruplar daha sık gözlenmekle birlikte benzer değerler elde edilmiştir.

Başlıca inme alt gruplarının sıklıkları ise şöyledir (14);

1. Serebral İskemi: %60-80
2. İntraserebral hemoraji: %10-15
3. Subaraknoid kanama (SAK): %3-10

Serebral iskemi: Klinik ve nöroradyolojik bulguların bazı iskemik inme alt gruplarında benzerlik göstermesi nedeni ile etiyolojik sınıflandırma oldukça güçtür.

1993 yılında yayınlanan “Trial of Organization in Acute Stroke Treatment” (TOAST) çalışmasında kullanılan sınıflandırma ise klinik bulguların yanı sıra etiyolojiye de yer verdiği için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (14). (Tablo 1)

Tablo 1. İskemik inmede TOAST sınıflandırması (12,14).

1. Geniş arter aterosklerozu (tromboz ve emboli)
2. Kardiy-embolizm
3. Küçük damar oklüzyonu (laküner infarkt)
4. Diğer belirlenen etyolojiler
5. Sebebi belirlenemeyen etyolojiler

İnme etiyolojisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, 1996 ve 2000 yılları arasında, izlenen 266 vakada laküner infarktlı hastaların nörolojik bulguları diğer subtiplere göre daha iyi iken, en geniş infarkt alanı geniş arter aterosklerozunda görülmüştür (15). Kardiyembolik infarkt anterior sirkülasyonda, diğer subtiplere nazaran daha sık gözlenmiştir (15).

İnme lokalizasyonuna göre yapılan sınıflama da Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2. İskemik inme alt gruplarının standartize sendromik sınıflaması (12,16)

- 1.Total anterior sirkülasyon infarkt
2. Parsiyel anterior sirkülasyon infarkt
3. Posterior sirkülasyon infarkt
4. Laküner infarkt

1- *Geniş arter aterosklerozu (tromboz ve emboli)*: Tüm iskemik inmelerin %50'si geniş arter sklerozuna bağlıdır. İskemi, özellikle ekstrakraniyal ve daha nadir olmak üzere intrakraniyal damarlarda ve bunların bifurkasyon bölgelerinde, yıllar içerisinde gelişen aterom plaklarının stabilizasyonlarının bozulmasıyla ortaya çıkan trombozlara bağlı olarak gelişir. Ortaya çıkan aterotrombotik lezyon damarın stenozu veya oklüzyonuna yol açar. Hemodinamik mekanizmalarla sınır bölgelerde infarktlara da yol açabilir. Bu mekanizmada proksimal arterin %70-80 ve üzerindeki darlıkları söz konusudur. Ayrıca, aterotrombotik lezyondan kopan trombosit, kolesterol gibi bazı parçaların arterden artere embolizasyonu ile distal arterleri tıkanması mümkündür. Geniş arter aterosklerozuna bağlı inmelerde, özgeçmişte sıklıkla 15 dakika ile 1 saat arasında süren geçici iskemik ataklar ve intermittan kladikasyo şikayeti bulunur (12,14). Klinik olarak serebral kortikal bozukluk (örneğin afazi, ihmal, apraksi, anopi) veya serebellar disfonksiyon görülür (17). Muayenede karotis üfürümü ve distal nabızların alınmaması ayırıcı tanıda önemlidir. Nörolojik defisit olarak, ekstremitelerde kuvvet kayıpları ve özellikle arterden artere embolizm vakalarında fokal kortikal bulgular ortaya çıkar (12,14). Tanısal çalışmalar kardiyojenik potansiyel emboli kaynağını dışlamalıdır. Radyolojik olarak anjiyogram veya ultrasonografi ile ipsilateral ekstrakraniyal ya da intrakraniyal damarlarda %50'nin üzerinde darlık veya ülsere plaklar görülmelidir. Aynı zamanda bilgisayarlı beyin tomografisi (BT) ya da manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde saptanan infarkt alanlarının çapının 1,5 cm'den büyük olması gereklidir (17).

2- *Kardiyembolizm*: Tüm iskemik inmelerin %20'sini oluşturan kardiyembolizmde arteriyel oklüzyonun sebebi kalpten kaynaklanan embolilerdir. Başlıca klinik bulgular ani gelişen ve bazen bilinç bozukluğunun eşlik ettiği inmelerdir. Epileptik nöbetler başlangıçta inme ile birliktelik gösterir. Bazı vakalarda ise ilerleyen saatlerde nörolojik defisitte hızlı düzelmeler gözlenir (12,14). Atriyal

fibrilasyonla (AF) birlikte ya da tek başına romatizmal mitral kapak hastalığı, non valvuler AF, hasta sinus sendromu, yakın zamanda geçirilmiş miyokard infarktüsü, kardiyak trombus, valvuler vejetasyon, sol ventrikülde akinetik segment, atriyal miksoma, dilate kardiyomiyopati, parodoksal emboli, prostetik aort ve mitral kapak gibi kardiyak emboli kaynakları bulunmalıdır (17). Beyin BT ve MR'de, geniş arter aterotrombozunda olduğu gibi, bir arter alanına uyan geniş kortikal infarktlar görülmekle birlikte, değişik vasküler alanlarda birden fazla lezyonun varlığı veya sistemik embolizm ayırıcı tanıda yol göstericidir (12). Anjiogram ya da ultrasonografide proksimal geniş arterde %50'nin üstünde darlık ya da ülsere plaklar gözlenmemelidir (17).

3- *Küçük damar oklüzyonu (laküner infarktlar)*: Genellikle HT veya diyabeti olan yaşlı hastalarda ortaya çıkan bu inme tipi, tüm iskemik inmelerin %25'ini oluşturur. Bu hastalık için karakteristik bulgular (pür motor, pür sensoriyel, sensorimotor inme ve ataksik hemiparezi vb) ve nöroradyolojik olarak 1,5 cm'den küçük, derin infarktların gözlenmesi tanı koydurur (12,14). Embolizm için kardiyak kaynak olmamalıdır ve geniş ekstrakraniyal arterlerin değerlendirmesinde ipsilateral arterde %50'nin üzerinde darlık gözlenmemelidir (12, 14, 17).

4- *Diğer belirlenen etiyolojiler*: Bu grupta santral sinir sisteminin (SSS) primer ve sekonder vaskülitleri, CADASİL ve serebral amiloid anjiopati gibi nadir küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları, mitokondriyal hastalıklar, travma ve diseksiyon ile kan hastalıkları yer alır ve tüm iskemik inmelerin %5'inden az yer tutar. Anjiografi, leptomeningeal biyopsi ve ayrıntılı hematolojik, biyokimyasal ve mikrobiyolojik testlerle tanı konur (12,14). Potansiyel kardiyoembolizm ve geniş arter aterosklerozu ekarte edilmelidir (12).

5- *Sebebi belirlenemeyen etiyolojiler*: Bu grupta ayrıntılı tetkiklere rağmen etiyolojisi bulunamayan serebral infarktlarla, yeterli tetkik edilemeyen vakalar yer alır. Ayrıca yapılan tetkiklerde birden fazla etiyolojik neden bulunan vakalar da bu grupta değerlendirilmiştir (12,14).

2.1.3. İnme Risk Faktörleri

Risk faktörlerinin belirlenmesi, değiştirilebilir olanların veya henüz bilinmeyenlerin ortaya konması, alınacak koruyucu önlemler açısından son derece önemlidir (17). İnmede risk faktörleri multifaktöriyel bir süreçtir (18) (Tablo 3).

Tablo 3: İnme Risk Faktörleri (19)

Değiştirilemeyen Faktörler	Değiştirilebilir Faktörler	
	Kesinleşmiş Faktörler	Kesinleşmemiş veya Yeni Risk Faktörleri
Yaş Cinsiyet İrk, Etnik Köken Hereditör, Ailesel Özellikler	HT Diabetes Mellitus, Hiperinsülinemi, Glikoz İntoleransı Kalp Hastalıkları Hiperkolesterolemi, Hiperlipidemi Geçici İskemik Atak (TİA) Asemptomatik Karotis Stenozu	Aşırı Alkol Kullanımı Obezite Fiziksel İnaktivite Beslenme Alışkanlıkları Hiperhomosisteinemi Oral Kontraseptif Kullanımı İlaç Kullanımı ve Madde Bağımlılığı Migren Fibrinojen Eksikliği Hiperkoagülabilité Enflamasyon (Fibrin oluşumu ve Fibrinoliz, Antikardiyolipin Antikorları)

- *Değiştirilemeyen Risk Faktörleri;*

a) *Yaş:* Yaş ilerledikçe inme riskinin arttığı bilinmektedir (12). SVO temel olarak yaşlı popülasyona ait bir hastalıktır ve hastaların %75'i 65 yaş ve üstünde yer almaktadır. Elli beş yaşından sonra her 10 yıl için inme oranının ikiye katlandığı bildirilmektedir (20). Başka bir çalışmada inme prevalansının yaşla birlikte arttığı belirtilerek bu artışın 65-69 yaş arası ile karşılaştırıldığında, 70-74 yaşlarında 1,81

kat, 75–79 yaşlarında 2,96 kat, 80–84 yaşlarında 3,55 kat ve 85 yaş üzerinde 2,86 kat olduğu gözlenmiştir (21).

b) *Cins*: İnme erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmekle birlikte, kadınlarda inme nedeni ölüm hızı daha yüksektir (12,21). Framingham her 10 yaş artışla inmenin erkeklerde 1,66 kat, kadınlarda 1,93 kat arttığını bildirmiştir (21).

c) *İrk*: Zencilerde, Çinlilerde ve Japonlarda inme insidansı, beyazlara göre daha yüksektir (12).

d) *Aile öyküsü*: Aile öyküsünün risk faktörü oluşunda çeşitli etmenler rol oynamaktadır. Bunlar benzer yaşam tarzları, beslenme alışkanlıkları ve bazı herediter özellikler olabilir. Faktör V Leiden, Arg 506 Gln için OR (Odds ratio): 1,33, metilentetrahidrofolatredüktaz C677T için OR:1,24, protrombin G20210A için OR:1,44, anjiotensin konverting enzim insersiyon/ delesyon için OR:1,21 olarak bulunmuş olup araştırılan diğer genlerle ilgili (faktör XIII, apolipoprotein E ve human antiplatelet antijen tip 1) anlamlı sonuçlar bulunmamıştır (12).

- *Değiştirilebilir Risk Faktörleri*;

a) *Hipertansiyon*: Tüm inme tipleri için birincil risk faktörüdür, değişik faktörlerle hemorajik ya da iskemik inme yaratmaktadır (12). Ege Tıp Fakültesi Acil servisine 1 yıl içinde başvuran 124 hastanın incelendiği bir çalışmada özgeçmişlerinde %58,8 Hipertansiyon (HT), %35 diyabet, %25 koroner arter hastalığı ve %20,1 daha önceden geçirilmiş SVO saptanmış (22). Kişinin sistolik basıncı 160 mmHg, diastolik basıncının 90 mmHg'nin üstünde olduğunda, rölatif inme riskinin 4 kat arttırdığı tahmin edilmektedir (21). İnme riski kan basıncı 130-139/85-89 mmHg olanlarda 1,5 kat artmıştır (23). HT (>160/95 mmHg) kronik olduğunda ateroskleroza hızlandırır ve böylece büyük arter tıkanması ve embolizmi kolaylaştırır. Obstruktif ateroskleroza neden olarak laküner infarkta yol açar. HT neden olduğu arteriolar mikroanevrizmalar aracılığıyla spontan intraserebral kanama yapabilir. Aynı zamanda idiyopatik atriyal fibrilasyon için de risk faktörüdür. Sistolik, diastolik ve kombine sistolik-diyastolik HT inme için risk faktörüdür. Minor iskemik inme ya da geçici iskemik atak geçirmiş kişilerde sistolik kan basıncının 10 mmHg azalmasının, inme riskini %10 azalttığı bildirilmiştir. Randomize çalışmalarda diyastolik kan basıncının 5–6 mmHg azaltılması durumunda, ilk inme atağı geçirme riskinin üç kat azalmakta olduğu bildirilmektedir (12). HT tedavisiyle

diyastolik kan basıncının 5–6 mmHg azaltılmasının, inme riskini %42 azalttığı gösterilmiştir. Sistolik HT olgularında yapılan bir çalışmada, HT tedavisi ile inme insidansında %36 azalma saptanmıştır (14). Son olarak ‘Sistolic hypertension in Europe’ (Syst-Eur) çalışmasında 60 yaş üzerinde izole sistolik HT’u bulunan hastalarda tedavi ile inme insidansında azalma %42’dir. İnme riskinin azaltılmasında, hangi değerlerin optimal değer olduğu tartışmalı olmakla birlikte, ‘Hypertension Optimal Treatment’ (HOT) çalışmasında, 140/85 mmHg altındaki değerlerin yararı ortaya konmuştur (12).

b) *Diyabetes mellitus (DM)*: DM büyük damar hastalığına bağlı iskemik inmede risk faktörüdür, fakat ufak damar hastalığına etkisi tartışmalıdır (12). Yapılan çalışmalarda diyabetin iskemik inme riskini 2-6 kat arttırdığı fakat İSK riskinde değişiklik yaratmadığı saptanmıştır (14,24). Diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada, uzun süre sıkı kan şekeri kontrolü ile izlenen hastaların mikrovasküler komplikasyonlarında azalma gözlenirken, inme riskinde ise bir azalma saptanmamıştır (25). Geçici iskemik atak ve vasküler inme risk faktörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, diyabet inme grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (26).

c) *Kalp Hastalıkları*: Gençlerde kriptojenik inmelerin %40’ında potansiyel kardiyak emboli kaynağı mevcuttur. Gençlerdeki en önemli embolijenik kalp hastalıkları AF ile birlikte veya yalnız olarak görülen mitral stenoz, kapak replasmanı yapılması, infektif endokardit, tek başına veya interseptal anevrizma ile birlikte olan patent foramen ovale (PFO), kardiyak tümörler, mitral regürjitasyon veya AF ile birlikte olan mitral valv prolapsusu, Lipman Sack endokarditi, dilate kardiyomyopatilerdir. Orta yaş üstünde myokard infarktüsü (MI) en sık görülen kardiyemboli sebebidir. MI’den sonra inme gelişme riski ilk 2 hafta içerisinde en yüksektir. İleri yaş ve ventriküler disfonksiyon, bu riski arttırmaktadır. Framingham Heart çalışmasında akut MI’dan sonra 6 yıl içerisinde inme geçirme riski erkeklerde %8, kadınlarda %11 olarak bulunmuştur. İleri yaşta en önemli emboli riski taşıyan hastalık nonvalvüler atrial fibrilasyondur. Yaş arttıkça görülme sıklığı artan bu hastalığın prevalansı 80-89 yaşlarında %8,8 olup rölatif riski 4-4,5 olarak bulunmuştur. Romatizmal olmayan atrial fibrilasyonda inme riski 5,6 kat artarken, romatizmal kalp hastalığı da varsa 17,6 kat artmaktadır. İleri yaşlarda, atriyal fibrilasyona bağlı inme riski belirgin olarak artmaktadır (12). PFO prevalansı 965

normal insanda yapılan otopsi çalışmasında %27'dir. PFO ve iskemik inme ile ilgili yapılan retrospektif çalışmaların meta-analizinde 55 yaşın altındaki kriptojenik inmeli hastalardaki PFO prevalansı nedeni bilinen inmeli hastalardan 6 kat daha fazla bulunmuştur. Mas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 18-55 yaşlarındaki iskemik kriptojenik inmeli ve PFO'su bulunan hastalar 4 yıl takip edilmiş. Yalnızca PFO'su olan hastalarda rekürren inme riski 4 yıl sonunda 2,3% iken, hem PFO'su hem de atriyal septal defekti olan hastalarda bu risk 15,2% olarak saptanmıştır (27).

d) *Hiperlipidemi*: Ülkemizde 40 Nöroloji merkezinin katıldığı ve 3100 inme olgusunun hastane tabanlı verilerinin analiz edildiği MST çalışmasında iskemik inmeli olguların % 41,5'inde, hemorajik inmeli olguların ise %78,7'sinde serum kolesterol yüksekliği tespit edilmiştir. Hiperkolesteroleminin hem iskemik hem de hemorajik inme için bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur (22). SPARCL çalışmasında düşük HDL kolesterol düzeylerinin rekürren inme ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (28). Yüksek inme riski olan 165 792 hastada, statinlerle yapılmış çalışmada tüm inme tiplerinin insidansı %18, ölümcül inme insidansı ise %13 azalmış olarak bulunmuştur ancak bu istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Meta-analizlerde LDL kolesterol düzeyinde her 1 mmol/L (39 mg/dl)düşüşün inme riskinde rölatif %2,1'lik azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (28). SPARCL çalışmasında inme riskinde en büyük azalma, 65 yaş altı ve aterotrombotik inme ve diyabeti olan karotis stenozlu hasta grubunda bulunmuştur. İnme riskinde SPARCL çalışmasında, başlangıçta karotis stenozu olan hastalarda statin tedavisiyle %33 azalma saptanmıştır (28). Meta-analizlerde 83 205 vakada statin çalışmalarının randomizasyonunda hemorajik inme risk artışının olmadığı bildirilmişse de, SPARCL çalışmasında hemorajik inme rölatif risk artışı %67'dir. Bu çalışmada atorvastatin tedavisi, erkek cinsiyet, ileri yaş, hemorajik inme, evre II HT hemorajik inme gelişimi ile ilişkilidir. Tedavi grubunda hemoraji riski ile bazal veya geçmiş LDL kolesterol düzeyi arasında ilişki bulunmamıştır. İnmeli hastalarda sekonder korumaya yönelik statinlerin major koroner ve diğer aterotrombotik olay riski yüksek olan hastalara verilmesi ve kolesterol düzeylerinin agresif olarak düşürülmemesi önerilmektedir. "European Stroke Organisation tarafından primer inmeden korunmada sık kolesterol düzeyi takibi ve LDL kolesterol 150 mg/dL'den yüksek olanlarda hayat stiline düzenlenmesi ile statin tedavisini önerirken, sekonder inmeden korunmada statin tedavisi kardiyembolik olmayan hastalara önerilmektedir.

SPARCL çalışmasında 70 mg/dL'ye düşürülmesi 100 mg/dl'ye düşürülmesine göre rölatif inme riskini %28 düşürmüştür. Bir çalışmada trigliserid düzeyinin %31'lik düşürülmesinin rölatif inme riskini %31 azalttığı gösterilmiştir (28). Kolesterol seviyesindeki artışın hem koroner arter hastalığı hem de tromboembolik inme riskinin arttırdığı bilinmektedir. Serum kolesterol düzeyi 280 mg/dL üzerindeki hastalarda inme risk artışından bahsedilmektedir (14). 'Multipl Risk Factor Intervention Trial' çalışmasında yüksek kolesterol düzeyi olan erkeklerde artmış mortalite oranı görülmüştür (12). Serum kolesterol düzeyi 240- 279 mg/dL olanlarda risk oranı 1,8, 280 'in üstünde olanlarda ise 2,6'dır. Simvastatin Survival çalışmasında, koroner arter hastalığı ve yüksek kolesterolü olan 4444 hastada simvastatin ile tedavi edilen grupta iskemik nonembolik inmede %51, geçici iskemik ataklılarda (GİA) %35 azalma görülmüştür. Ultrasonografik çalışmalarda karotis aterosklerozu ve intima-media kalınlığı ile serum lipidleri arasında yakın ilişki görülmüştür (12). Statinlerin karotid arterlerdeki intima-media kalınlaşmasının progresyonunu geri döndürebildikleri gösterilmiştir (28). Statinlerin sadece inme riskini azaltmakla kalmayıp aynı zamanda karotis arter aterosklerozunu inflamasyon, endotelial disfonksiyon ve platelet sayısını azalttığı, kan basıncını düşürdüğü ve miyokard infarktüsü insidansını azaltarak beyine tromboembolik komplikasyonları azalttığı gösterilmiştir. Statinlerin aynı zamanda nöroprotektif etkisi de olabilir (28).

e) *Sigara*: 'Framingham Heart Study' çalışmasında bu risk 1,8 olarak bulunmuş olup, bu risk, sigara bırakıldıktan 5 yıl sonra içmeyenlerin düzeyine inmekte, diğer çalışmalarda ise 1,2-1,3 arasında bulunmaktadır (12). Sigara dumanına maruz kalanlarda da bu risk en az 1,2 bulunmuştur. Sigara içmenin kan fibrinojen konsantrasyonunu yükselttiği, trombosit agregasyonunu ve hemotokriti arttırdığı ve aynı zamanda artmış fibrinojen konsantrasyonu ve yükselmiş hemotokritin birlikte kan viskozitesini arttırdığı gösterilmiştir. Aktif sigara içenlerdeki populasyonun %18'i, daha önceden içmiş olanların %6'sı ve pasif sigara içenlerin de %12'si risk altındadır (12).

f) *Karotis Üfürümü ve Asemptomatik Karotis Stenozu*: İskemik inmenin en önemli önlenebilir nedelerinden biridir. Pek çok merkezde MR anjiyografi, BT anjiyografi ve doppler USG gibi non-invaziv tekniklerle tanı konur, DSA altın standart olsada bu non-invaziv yöntemler onun yerini almıştır (29). Yüzde 50'den fazla asemptomatik karotis arter stenozu; 65 yaş üzerindeki erkeklerde %7-10,

kadınlarda %5-7 dir. İnme riski stenozun derecesinin artmasıyla yükselmektedir (12). %75'in altındaki darlıklarda asemptomatik hastalar için inme riski %1' den az iken, %75'in üstü darlıklarda %2-5'e çıkar. Risk semptomatik hastalarda (örneğin geçici iskemik atak ve inme geçirmiş olanlarda) ilk yılda % 10 ve ilk 5 yılda %30-35'e yükselir. NASCET (The North American Symtomatic Carotid Endarterectomy Trial), ECST (The European Carotid Surgery Trial) ve Veteran Cooperative Studies Program Trialkarotid çalışmalarında endarterektomi ve medikal tedavi faydaları karşılaştırılmıştır. %70-99 darlıkta NASCET çalışmasında 5 yıllık takipte risk azalması %16'dır. Orta düzeydeki darlıklarda (%50-69), 5 yıl sonrasında mutlak risk %4,6 azalmaktadır. Asemptomatik karotis arter hastalığında endarterektominin yeri yetersiz tanımlanmıştır (29). Asemptomatic Karotid Atherosclerosis Study (ACAS)'de %60'dan fazla karotis darlığı olanlarda, karotis endarterektomisinin etkinliğini araştıran bir çalışmada, hastaların 828'i cerrahi ve medikal grubuna, 834'ü sadece tıbbi tedavi grubuna alınmıştır. Bu hastalarda perioperatif inme riski %2,3 olarak bulunmuştur (12). Bu çalışmada % 60 üstündeki darlıklarda cerrahi uygulanan grupta 5 yıl içinde ipsilateral inme oranı % 11 iken tedavi grubundaki inme oranı % 5,1 bulunmuştur. ACST (Asemptomatik karotis cerrahisi) çalışmasında asemptomatik hastalardan, karotis endarterektomisinden en ılımlı faydalanabilecek olanlar 75 yaşından genç ve en az %70 darlığı olanlardır ve bunlarda endarterektomiyle inme riskinin %12'den %6'ya indiği gösterilmiştir. Endarterektomi, semptomatik ciddi karotis darlığı olan hastalarda yararlıdır ancak hafif derece darlığı olan ve asemptomatik vakalarda medikal tedaviyle arasındaki fark net değildir (29).

g) *Geçici iskemik atak ve tamamlanmamış inme*: Tüm inmeler için önemli risk faktörüdür (30). Geçici iskemik atak (GİA) geçiren hastalarda inme riski ortalama %4'tür (28). Sık TİA'lar yüksek inme riski taşır. Bir önceki inme, ikinci bir inme için tek başına GİA'dan büyük risk faktörüdür (30). Kalp kökenli infarktlarda %12 iki hafta içinde, aterotrombotik infarktlarda %1,3–2,3 bir-üç ay, %10 bir yıl ve %20 beş yıl içinde tekrarlama riski vardır (12). SVO tipine ve risk faktörlerine göre tekrarlama riski değişir. SVO tüm tipleri için, inme sonrası ilk bir yılda tekrarlama riski en yüksektir ve zamanla kademeli olarak azalır (30).

h) *Orak Hücreli Anemi*: Bu hastalarda 20 yaşına kadar inme prevalansı %11'dir. 'Stroke Prevention Trial' (STOP) çalışmasında sık kan transfüzyonları uygulanan grupta, inme riskinin yılda %1,02'dan %1'e düştüğü gösterilmiştir.

- *Kesinleşmemiş Risk Faktörleri*;

a) *Obesite*: Vücut kitle indeksi $>30 \text{ kg/m}^2$ olması durumunda kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalığa yatkınlık doğmaktadır (12). Obezite; kan basıncı, kan glukozu ve serum lipitlerinin yüksekliği ile birlikte ki; bunların hepsi inme için bağımsız birer risk faktörüdür. Ayrıca abdominal yağ birikimi ile birlikte olan santral obezite, aterosklerozla ilişkilidir (19).

b) *Alkolizm*: Bir alkolik epizod veya kronik alkolizm tüm inmeler için, özellikle hemorajik inme için, önemli bir risk faktörüdür (12).

c) *Hiperhomosisteinemi*: Hiperhomosisteinemiye bağlı aterotrombotik mekanizmalar kalınlaşmış intima, artmış trombosit dönüşümü, artmış trombosit aktivasyonu ile birlikte artmış tromboksan sentezi, endotelial bozukluklar, lökosit aktivasyonu, oksidatif stres ile LDL'nin artmış oksidasyonu, artmış köpük hücre oluşumu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu olarak bildirilmektedir. Hiperhomosisteineminin reaktif oksijen ürünleri oluşturarak veya direkt olarak endotelial düz kas hücre işlevlerini etkileyerek aterojenik süreci başlattığı düşünülmektedir. Framingham çalışmasında, yüksek homosistein düzeyi yüksek olan hastalar, düşük düzeyi olan hastalarla karşılaştırıldığında rölatif risk oranı 1,82 bulunmuştur (12).

d) *Fiziksel İnaktivite*: 'Northern Manhattan Stroke Study' çalışması yoğun fiziksel aktivite yapanların, hafif- orta yapanlara göre daha az risk taşıdıklarını göstermiştir. Son çıkan rehberlerden olan 'Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health' her gün yaklaşık olarak 30 dakika egzersizi önermektedir (12). Fiziksel aktivite; kan basıncını, vücut ağırlığını ve nabız hızını düşürür, HDL kolesterolü yükseltir, LDL-kolesterolü düşürür, platelet agregasyonunu azaltır, insülin hassasiyetini azaltarak glukoz toleransını düzeltir (19).

e) *Hormon Tedavisi*: 1) Oral kontraseptif kullanımı ile inme riski, içlerindeki estradiol düzeyi ile ilişkili olup, $50 \mu\text{g}$ 'dan fazla estradiol içeren ilk jenerasyon ilaçlarda bu risk yüksektir. Oral kontraseptif alanlarda yapılan prospektif ve kontrollü çalışmalarda, iskemik inme riskinin göreceli olarak 5-26 kat arttığı, SAK geçirme

riskinin 3-6 kat arttığı gösterilmiştir (12). 2) Hormon replasman tedavisi yapılan kadınlarda, Framingham çalışmasında aterotrombotik inme riski 2,6 olarak bulunmuştur (12).

f) *Madde Bağımlılığı*: Eroin, kokain ve amfetamin gibi bağımlılık yapan maddelerin hem hemorajik hemde iskemik inmeye yol açtığı bilinmekteyse de bu konuda geniş epidemiyolojik çalışmalar mevcut değildir. Bu maddelerin etkileri multifaktöriyel olup, ani kan basıncı yüksekliği, vaskülit ve hematolojik bozukluklara yol açarak inmeye neden olurlar. İnme ile en çok ilişkili görünen madde kokaindir (31). Sınırlı çalışmalarda, inme riskinin 7 kat arttığı bildirilmektedir (12).

g) *İnflamasyon*: Hem aterosklerozun başlangıcında hem progresyonunda hem de aterosklerotik plağın rüptüründe rol oynar. Pek çok inflamasyon markırı iskemik inmenin göstergesi olarak tanımlanmıştır. Lökosit sayısı ilk kez miyokard infarktüsü veya iskemik inme geçirme için sigaradan ve diğer vasküler risk faktörlerinden bağımsız bir risk faktörü olarak meta-analizlerde gösterilmiştir. Nötrofil sayısı özellikle artmış risk ile en ilişkili olanıdır. Yapılan çalışmalarda özellikle rekürren olaylarda bir hafta öncesinde lökosit sayısında artış olduğu saptanmıştır (32).

Tromboembolik inmeyle, CRP arasında yakın ilişki olduğuna son zamanlarda değinilmektedir. CRP'nin, hipertansif kişilerde, sigara içenlerde ve vücut kitle indeksi fazla olanlarda yüksek olduğu, fakat fiziksel aktiviteyle düştüğü görülmüştür. Yapılan 10-15 yıllık izlem analizlerinde, yüksek CRP düzeyleriyle tromboembolik inme riski 2,6 kat arttığı saptanmıştır. Enfeksiyona ikincil olarak hem sistemik hem de direkt arteriyel invazyon yoluyla aterosklerotik süreç gelişebilir. Herpes virus ailesinden sitomegalovirus ve klamidyia pnömonia aterosklerotik inmede etkili olduğu düşünülen başlıca enfeksiyöz ajanlardır (12).

h) *Migren*: Bir çalışmada 40 yaş üzerindeki erkeklerde inme için bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur, ancak diğer çalışmalar bunu doğrulamamıştır (19). Migren ile birlikte inmenin görüldüğü CADASIL ve antifosfolipid antikor sendromu gibi oldukça nadir hastalıklar dışında, migrenin iskemik inme için risk faktörü olup olmadığına ilişkin yapılan çalışmalardan biri olan 'Physicians Health Study' çalışmasına da migrenin iskemik inme için risk faktörü olduğu ve auralı migrenlilerde bu oranın aurasız migrene göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (12).

1) *Fibrinojen yüksekliği*: Hem karotis arter stenozunda, hem de tekrarlayan inmede bir risk faktörüdür. Fibrinojenin bu etkisi, viskozite, trombositler ve aterogenezisle ilişkili olabileceği gibi, pıhtı oluşumundaki direkt rolü ile de ilişkili olabilir (20).

i) *Hiperkoagülabite*: Hiperkoagülasyonu yol açan trombofililerde de (Protein C, protein S, anti-trombin III eksikliği, faktör V leiden mutasyonu, protrombin 20210 A mutasyonu ve antifosfolipid antikoları pozitifliği) venöz tromboz artmış olarak görülür ancak iskemik inme de neden olabilirler.

2.1.2.Fizyopatoloji

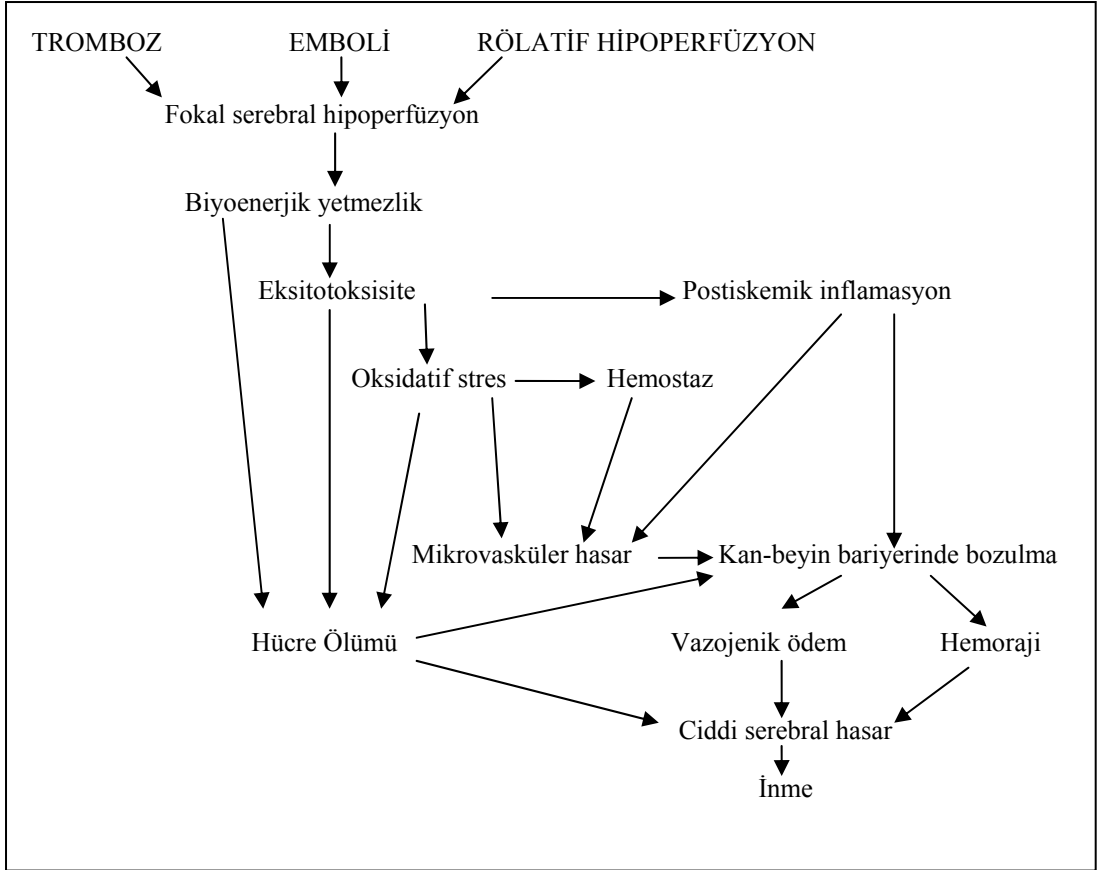
Serebral kan akımını, serebral perfüzyon basıncı ile serebral vasküler rezistans arasındaki oran belirler. Sistemik arteriyel kan basıncı azaldığında veya intrakraniyal basınç arttığında, beyinde genel olarak perfüzyon basıncı azalır (12).

Otoregülasyon serebral kan akımında değişiklik olmadan sistemik arteriyel kan basıncının ve serebral perfüzyon basıncını belirli değerler arasında tutan düzenleyici bir mekanizmadır. Böylece serebral kan akımı, ortalama arteriyel kan basıncının 50-60 mmHg ile 150-160 mmHg arasındaki oynamalarında son derece iyi bir şekilde korunmaktadır. Serebral perfüzyon basıncı düştükçe, otoregülasyon kapasitesi aşılana kadar meydana gelen vazodilatasyon, serebral kan akımını korumaktadır. Bu kapasite aşıldıktan sonraki serebral perfüzyon basıncı düşmeleri, serebral kan akımında azalmayla sonuçlanır (12).

Beyin kan akımındaki azalmanın en fazla olduğu çekirdek bölgesinde, hücreler dakikalar içinde geri dönüşsüz olarak zedelenir (12). Ancak iskemik bölgenin periferinde kollaterallerce sağlanan rezidüel kan akımının olması, nöronların kısa bir süre için de olsa biyokimyasal bütünlüğünü korur. Bu bölgeye ‘penumbra’ denir. Penumbra anatomik bir alan değildir; iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak iskemik alanın infarkta doğru ilerlediği dinamik bir süreçtir (33). İskemik kaskad mekanizmaları bu sınır zonda devam etmektedir, bu da hücrel hasarlanma ve infarkt gelişimi ile sonuçlanır. Genellikle inme başlangıcından saatler sonra, iskemik

penumbra bu progresif olaylardan etkilenir. Yine de penumbra, kan akımının sağlanması veya iskemik kaskadın kesilmesi ile kurtarılabilir (2). İskemik beyin bölgelerinde oteregülasyon mekanizması bozuktur. Sonuç olarak, penumbra bölgesindeki kan akımı sistemik kan basıncına ve kan vizkozitesine bağımlı hale gelir. Böylece, sistemik arteriyel basıncındaki düşme iskemik bölgenin genişliği ve şiddetinde önemli bir artışa neden olabilir (12).

Akut iskemik inmenin nöropatogenezinde fokal hipoperfüzyon, eksitotoksite, oksidatif stres, kan-beyin bariyerinin bozulması, mikrovasküler hasarlanma, hemostaz, post iskemik inflamasyon ve nöron ölümü yer alır. İskemik kaskad saatler boyunca ya da günlerce devam eder (2).



Şekil 1. Nöropatogenezde rol alan mekanizmalar (2)

Nöropatogenezde rol alan mekanizmalar (Şekil 1):

1) *Serebral hipoperfüzyon*: Normal şartlarda 50-55 ml/ 100 gr/ dk düzeyindeki serebral kan akımı nöronların ve diğer serebral hücrelerin fonksiyonlarının kesintisiz

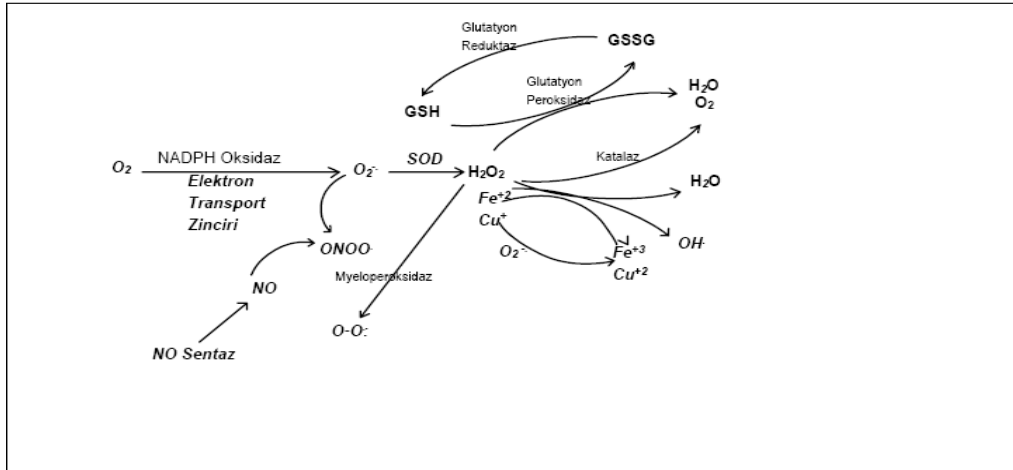
olarak devam etmesi için hassas bir regülasyonla sabit tutulur (12). Serebral kan akımı 20 ml/100 gr/dakikanın altına düştüğünde, beyinin elektriksel aktivitesi yetersiz kalır ve nörolojik semptomlar ortaya çıkmaya başlar (12). Kısa sürede yeterli perfüzyon sağlanamaz ise, oksijen seviyesinin yetersizliği nedeniyle, 10–12 ml/100 gr/dk düzeyindeki kan akımında mitokondriyal metabolizma inhibe olur, anaerobik glikoliz metabolizması aktive olur. Böylece laktik asit düzeyi yükselip pH düşer ve intrasellüler-ekstrasellüler asidoz gelişir. İyon homeostazını sağlayan enerjiye bağımlı hücre membran fonksiyonu giderek bozular. Potasyumun ekstrasellüler alana, sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{+2}) ve bunlarla birlikte suyun intrasellüler alana girişi başlar. Serebral kan akımının 10–12 ml/ 100 gr/dk düzeyine inmesi geri dönüşsüz hücre hasarın başladığı kritik eşik değer olarak kabul edilir (12). Hipoperfüzyon tromboz, emboli, rölatif hipoperfüzyon gibi farklı nedenlerle gelişebilir. Pekçok olguda etken büyük servikal veya intrakraniyal arterlerin aterosklerozudur. Diğer etyolojiler de küçük penetran arterlerin oklüzyonu (laküner inme), arterit, arteriyel diseksiyon ve değişik genetik ve hematolojik hastalıklardır (2). Tüm infarktların yaklaşık %99'u trombotik ya da embolik olayların sonucunda oluşur ve hemen hepsi arter tıkanması sonucu gelişir. Bazen infarkt lokal vazospazm, bir aterosklerotik plakın içine kanama veya bir damarın dıştan basıya uğraması nedeniyle de oluşabilir (14).

2) *Hücre sel biyoenerjik yetmezlik:* Beyin dokusu yüksek miktarda oksijen (O_2) ve glikoza ihtiyaç duyar ve enerji üretimi için oksidatif fosforilasyon yapar (2). Fokal hipoperfüzyon hızla enerji bağımlı iyon transport pompalarının disfonksiyonu ve nöronların depolarizasyonuna yol açar. Somatodendritik ve presinaptik voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları aktive olur ve eksitator aminoasitler ekstrasellüler boşluğa salınır. Aynı zamanda enerji bağımlı presinaptik eksitator aminoasitlerin geri alımı gecikir, bu da ekstrasellüler boşlukta glutamati artırır (2). Hücreler fizyolojik koşullarda fazla Ca^{+2} u atarak hücre içi Ca^{+2} artışını tolere ederler. Fakat enerjinin az olduğu durumlarda, pompa ve sekestrasyon mekanizmaları çalışmaz ve hücre içinden atılamayarak biriken Ca^{+2} düzeyindeki ani artışlar, lipazları, proteazları, endonükleazları aktif hale getirir ve serbest radikal oluşumunu arttırarak nöronal ölümü tetikleyebilir (33). Proteolitik enzimler plazma membranını ve hücre iskeletini oluşturan madde ve zincirleri yıkar. Lipolitik enzimlerin aktivasyonu ise nöron membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asid döngüsünün başlamasına neden olur.

Bu döngüde prostoglandinler, lökotrienler ve tromboksanlar sentezlenir. Olay serbest radikal ve lipid hidroksiperoksidlerin yapımıyla ve kısır bir döngü içinde ilerleyerek nöronun ölümüyle sonuçlanır (34).

3) *Eksitotoksisite*: Glutamat merkezi sinir sisteminin primer eksitatör nörotransmitteridir. İskeminin başlangıcında ortaya çıkan ön dejenerasyon bu nörotransmitterin ekstrasellüler boşluğa yayılmasına neden olur (1). Glutamat, AMPA, kainat ve NMDA tipi glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucu Na^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarının geçişini artırır (2). Aşırı miktarda glutamata maruz kalınması NMDA reseptörü aracılı gecikmiş hücre ölümüne neden olabilir. NMDA reseptörü yakınındaki bölgelerde lokal olarak Ca^{+2} yükselmesi nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimini aktive eder bu da NO artışı ile sonuçlanır. Endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını engelleyen dantrolenin fokal iskemi modellerinde infarkt hacmini küçülttüğü gösterilmiştir (34). Hücre içine Ca^{+2} VSKK ve NMDA reseptörü olmak üzere başlıca iki yoldan girer. Yapılan bir çalışmada nonkompetitif NMDA antagonisti olan memantinın iskemi proflaksisinde etkili bir ilaç olduğu, kalsiyum kanal blokleri olan nimodipinin ise proflakside zayıf etki gösterdiği, iki ilacın kombine kullanımının memantinın tek başına kullanılmasıyla sağlanan proflaktik etkiyi ancak hafif derecede arttırdığı gösterilmiştir (35).

4) *Oksidatif stres*: Serbest radikaller normal fizyolojik koşullarda rol oynarlar, birçok hücrel enzim ve taşıma sisteminde ara ürün olarak sınırlı miktarda oluşurlar. Oluşan serbest radikaller, normal fizyolojik koşullarda biyolojik korunma mekanizmaları ile ortamdaki uzaklaştırılırlar; SOD, GSH-Px ve KAT gibi enzimlerle zararsız hale getirilebilirler (33).



Şekil 2. Serbest radikallerin oluşumu ve detoksifikasyonu (36)

Endojen hücrel antioksidan mekanizmalarını aşan durumlarda oksidatif stres meydana gelir (36). Serbest radikaller serebral kan akımını etkilerler; NO ile süperoksitin etkileşimine bağlı olarak CO₂'ye vasküler yanıtı geciktirir ve vazodilatasyon yerine vazokonstriksiyon yaparlar. Ek olarak platelet agregasyonunu arttırmaları (2). Postiskemik dokularda major serbest oksijen radikalleri kaynağı olan ksantin oksidaz enzimi reperfüzyon sonrası moleküler oksijeni kullanarak hipoksantinine ksantine çevirir (37).

Serbest oksijen radikalleri süperoksit, H₂O₂ ve hidroksil radikalleridir.

Superoksit radikali (O₂⁻). Oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur (38) (Şekil 2). O₂⁻, hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumunda primer radikaldir (2).

O₂⁻ bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H₂O₂ kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (36). O₂⁻ ve H₂O₂ zayıf reaktifler olup dokuda direkt hasar oluşturmazlar. Demir gibi maddelerin varlığında daha güçlü reaktiflere çevrilirler ve hücre hasarına katkıda bulunurlar (37).

H₂O₂ radikali: O₂⁻ serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzimdir ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan SOD aracılığı ile H₂O₂'e indirgenir (38) (Şekil 2). H₂O₂ üretildiği bölgede kalan O₂⁻'nin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. O₂⁻ ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. H₂O₂ başka bir şekilde de serbest Fe⁺² ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (36).

Hidroksil (OH) radikali: OH⁻ bilinen en reaktif radikaldir. H₂O₂ geçiş metallere varlığında toksik OH⁻ radikaline dönüşür (36) (Şekil 2).

Yüksek toksik peroksinitritin (ONOO⁻) NO ve O₂⁻'den oluşumu önemlidir (2) (şekil 2). NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur. Bununla birlikte O₂⁻ düzeylerinin arttığı durumlarda O₂⁻ ile reaksiyona girer ve bir prooksidan olan ONOO⁻ oluşturur (36). NO' in O₂⁻ anyonu ile reaksiyona girmesiyle oluşan ONOO⁻ anyonu, NO' e bağlı hücre ölümünde ana mekanizma olabilir (33). Serbest oksijen radikalleri intrasellüler

depolardan Ca^{+2} salınımı ile protein denatürasyonu ve lipid peroksidasyonu sonucu hücre iskeleti ve DNA'da hasar yapar (2).

5) *Kan beyin bariyerinin (KBB) bozulması:* Nöronal mikroçevre KBB tarafından korunur. Akut iskemik inme sırasında KBB'nin bozulma insidansı %15-66 arasında bildirilmiştir. Bu inmenin ciddiyeti ve gelişim zamanına bağlıdır. Pekçok mekanizma KBB'nin hasarına yol açar; özellikle bifazik olduğu ve reperfüzyondan sonra olduğu düşünülmektedir (2). Serebral iskemide ve reperfüzyon sonrası ortaya çıkan NO ile O_2^- ve bunların reaksiyona girmesiyle oluşan ONOO⁻'in KBB yıkımındaki esas faktörlerden olduğu gösterilmiştir (33). Endotel bazal lamina çözülmesi, iskemide başladıktan 2 saat sonra başlar ve bunu KBB geçirgenliğindeki artış izler. KBB'de erken bozulmayı infarktın 24-72 saat sonra olan 2. faz hasarı izler. KBB bozulması, beyin parankimine kan komponentlerinin sızmasına neden olur. Yüksek molekül ağırlıklı bu maddelerin ekstrasvazasyonunu su ozmozuna izler ve bu da vazojenik ödeme yol açarak intrakraniyal HT'ye sekonder hasarlanmaya yol açar. Ek olarak kırmızı kan hücrelerinin ekstrasvazasyonu infarkt bölgesinde hemorajik transformasyona yol açar (2).

6) *İskeminin indüklediği mikrovasküler hasar:* Akut serebral iskemide, serebrovasküler otoregülasyon bozulur, iskemide indüklenen endotel hasarı bunda rol oynayabilir. Endotel hasarı, NO ve prostosiklin salınımını azaltır ve endotelin1 üretimini uyarır. Bu durum vasküler tonusu artırarak infarkt bölgesinde ve kollaterallerde kan akımını etkiler, iskemik hasarlanmayı artırır. Vazokonstrüksiyona ek olarak otoregülasyonun bozulması penumbranın kan basıncı değişikliklerinden korunamamasına neden olur. Akut inme döneminde meydana gelen hipotansiyon doku hasarlanmasını artırır (2).

7) *Hemostazın aktivasyonu:* Endotel hasarı doku faktörlerinin kana salınmasıyla sonuçlanır. Aktive plateletler vasküler oklüzyondan 2 saat sonra mikro damarlarda yığılır. Trombositler, tromboksan A_2 salgılayarak vazospazma neden olabilir ve inflamatuvar kaskadı lökosit migrasyonunu sağlayan medyatörlerle alevlendirirler (2).

8) *İskemi sonrası inflamasyon:* Beyin iskemisi ve reperfüzyon nöronal harabiyete yol açan inflamatuvar yanıtı indükler. Nöronlar, astrositler, mikroglia ve hepsinden ziyade endotel hücreleri iskemide yanıt olarak aktif hale gelir ve sitokinler salgırlar (39). Öncelikle mikroglia ve astrositler reaktif O_2 ürünleriyle aktive olur. Astrositler sitokinler, kemokinler ve indüklenebilen NOS salgırlar. İskemiden 4-6

saat sonra lökositler damar duvarına yapışır ve daha fazla proinflatuar mediatör salınımına bağlı penumbranın sekonder hasarlanması gerçekleşir. İskemik beyin hücrelerinde, inflamasyonla ilişkili en çok çalışılmış sitokinler IL1, TNF α , IL6 ve IL10 dur (2). Bu sitokinler ateş, C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının artışı, lökosit agregasyonu ve hücre adezyon moleküllerinin salınımında önemli rol oynarlar. Moleküler belirteçlerin inme riski ve iskemik hasarın göstergesi olarak kullanımı gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır (39). Proinflatuar sitokin artışı ve antiinflatuar IL 10 düzeyinin düşük olması, daha büyük infarkt ve daha kötü klinik ile ilişkilidir (2). İnflatuar sitokinler (interlökin-6 ve tümör nekroz faktör- α) ve hücre adezyon molekülleri erken nörolojik kötüleşme ve infarkt hacminde büyümeyle ilişkilidir. Son olarak, metaloproteinazlar (MMP) hemorajik transformasyon gelişiminde önemli rol oynarlar. Klinik çalışmalar, yüksek MMP-9 düzeyleri ile hemorajik transformasyon riski arasında bir ilişkinin varlığına işaret etmektedir (39). Hemorajik transformasyon gelişen hastalarda MMP-9 konsantrasyonu 3 kat daha yüksek bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmalar, lökosit sayısı ve fibrinojen gibi bazı sistemik belirteçlerin, iskemik vasküler olay riskiyle birlikteliğini göstermiştir (39). Yeni bir çalışmada, yüksek hassasiyette CRP düzeylerinin, inme sonrası daha yüksek mortalite ve inme şiddetiyle ilgisi gösterilmiştir (39).

9) *İskemiyle indüklenen hücre ölümü*: Eğer hücre nekroz nedeniyle ölürse, daha fazla glutamat ve toksin salınımı olur ve çevredeki nöronları da etkiler. Bunun paralelinde pek çok beyin hücresi de apoptozise gider. Bu olay genetik materyalde değişiklik ya da hafif inflamasyon durumunda hücreyi ölüme götürmeye düzenlenmiş bir programdır (2). Fokal iskemi oluştuğunda bazı hücreler eksitotoksik şişme, osmotik parçalanma ve nekrozla hızla ölürken bazıları da apoptotik mekanizmalarla yavaş yavaş ölmektedir. Bazı hücrelerde ise apoptoz ve nekroz özellikle birlikte gözlenmektedir. Nöronlardaki nekrozun klasik morfolojik bulgusu erken hücrel şişme, plazma ve nükleer membran bütünlüğünün kaybı ile ortaya çıkan hücrel parçalanmadır. Apoptozisde ise nükleer büzülme, kromatin öbeklenmesi, nükleer segmentasyon ve apoptotik cisimcikler görülmektedir. Çok kısa süreli (10-20 dk) iskemiden sonra dokuya kan sağlandığında, nöronlar canlılıklarını başlangıçta kazansalar da yaklaşık 3 gün içinde yavaş yavaş ölürler. Bu durum gecikmiş hücre ölümü olarak adlandırılır (33). Gecikmiş hücre ölümü, hücre

içine NMDA reseptörlerinde aşırı Ca^{+2} girişi sonucu gerçekleşir. Fosfolipaz A_2 , kalpain gibi Ca^{+2} bağımlı enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikal oluşumu gecikmiş hücre ölümüne yol açar (33).

İskemi Reperfüzyon Hasarı:

Beyinde 10 dakika gibi kısa bir sürede iskemik hasarın oluştuğunu ve reperfüzyon hasarının oluşması için 15 dakikalık bir sürenin yeterli olduğunu gösteren yayınlar vardır (37). Kan akımının hızla sağlanması, penumbra alanının hızla kurtarılmasını sağlayabilir. Paradoks olarak reperfüzyon beyin hasarını arttırabilir ve serebral reperfüzyon hasarı geliştirebilir. Reperfüzyon hasarı multifaktoriyel etiyojolojiye sahiptir (2). Etiyolojisinde iyi bilinen 4 temel mekanizma vardır. Bunlar hidrostatik zararlanma, immün sistem ve platelet kaynaklı mediatörlere bağlı zararlanma, peroksinitrit oluşumu ve eksitotoksisitedir.

a) Hidrostatik zararlanma: İskemi nöral doku kadar bu reaktif vasküler yatağı da hasarlar; yapısal bütünlüğünü ve direncini bozar. Reperfüzyonla birlikte ani olarak artan intravasküler basıncın vazokonstriksiyonla dengelenememesi, reperfüzyonla gelişen intraserebral kanamanın ana sebebidir (1).

b) İmmün sistem hücreleri ve platelet kaynaklı mediatörlere ikincil hasarlanma: Lökositler reperfüzyon hasarı, endotel hasarı, küçük damarların obstruksiyonu, KBB'nin bozulması ve inflamasyonda önemli rol oynarlar. Plateletler reperfüzyon hasarında oksidatif stres ürünlerinin açığa çıkmasına ve inflamasyon kaskadının alevlenmesine yol açan biyokimyasal mediyatörler salgırlar (2).

c) Nitrik oksite ikincil zararlanma: İskemide hücre içi Ca^{+2} artışını takiben yapısal olarak mevcut NOS aktivitesinin arttığı düşünülmektedir. Ancak yapısal olarak mevcut olan NOS'ın aktivitesi iskemi başlangıcında artışından hemen sonra azalmaktadır. Yapısal olarak mevcut NOS'un tekrar aktive olduğu reperfüzyonda, ikinci defa NO ve peroksinitrit oluşumunda artış olur (33). Peroksinitrit iskemik beyin dokusunda oluşan kan beyin bariyeri bozukluğunun temel nedenidir (2). NO'ın geç ama uzun süreli artışı iskemi sonrası 24-72 saatte ortaya çıkar, mikrogliya ve beyine giren inflamatuvar hücrelerdeki indüklenen NOS (i-NOS) tarafından gerçekleştirilir (33).

d) Eksitotoksisite: Serebral iskemide nöron ölümlerinin en önemli sebeplerinden

biri de aşırı glutamat salınımına bağlı eksitotoksisitedir (1). Eksitatör nörotransmitter toksisitesi, akut şişme ve geç dejenerasyon olmak üzere başlıca iki fazdan oluşur. Akut değişiklikler hemen daima nöronun depolarizasyonu ile başlar. Sonuç olarak hücre dışındaki Cl^- oluşan elektrokimyasal çekime bağlı olarak hücre içine girer. Bunu iyon dengesinin devam ettirilmesi için katyon (sıklıkla Na^+) girişi de izler. Olay hücre şişmesi ile sonlanır. İkinci faz hücre içine aşırı Ca^{+2} girişidir (34). Glutamat hem NMDA grubu voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarını açık tutarak hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun hızla yükseltmesi hem de ikincil mesajcılar yoluyla NOS enzimini arttırarak penumbra da yer alan nöronların dejenerasyonuna yol açar (1).

2.1.5 Serebral İskemide Tedavi

Serebral iskemi tedavisinde antiagregan, antikoagulan, trombolitik, antiödem ve nöroprotektif tedaviler yer alır (14).

1) Akut iskemik inmede antiagregan tedavi: Akut iskemik inmede üzerinde en çok araştırma yapılmış antiagregan ajan aspirindir. Tiklopidin, klopidogrel, dipridamol ve glikoprotein IIb/IIIa antagonistleri ile akut dönemde tedavi konusunda henüz yeterli bilgi yoktur. Aspirinin akut iskemik inmedeki rolünü araştıran üç önemli çalışma yapılmıştır. Bunlar Multicentre Acute Stroke Trial-Italy (MAST-I), International Stroke Trial (IST) ve Chinese Acute Stroke Trial (CAST) çalışmalarıdır. CAST çalışmasında ise 20 653 hastaya 160 mg aspirin tedavisi ilk 48 saat içerisinde başlanmış, 4 hafta bu tedaviye devam edilmiştir. Aspirin grubunda izlenen ölüm oranı %3,3 iken plasebo grubunda bu oran %3,9 olarak saptanmıştır. İki grup arasında aspirin lehine ölüm oranında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Rekürren inme oranında da aspirin lehine azalma saptanmıştır. Bu çalışmada ekstrakraniyal kanamalarda artış, aspirin grubunda istatistiksel olarak anlamlı iken; intrakraniyal kanamadaki artış, istatistiksel olarak anlamlı değildir (12,14). IST ve CAST çalışması ortak ele alındığında aspirin tedavisi verilen her 1000 hastadan 11'inde iskemik inme engellenirken, 1 hastada intrakraniyal kanama gözlenmiştir (12,14). Akut iskemik inme olgularında belirgin sakınca yoksa ve BT ile hemorajik inme dışlanmışsa, aspirinin bütün hastalara rutin başlanması gerektiği

ileri sürülmüştür. Akut iskemik inme klavuzları da bu doğrultuda aspirin kullanılmasını önermektedir (14).

2) Akut iskemik inmede antikoagülan tedavi: Heparin tedavisinin iskemik inmelerde ilerlemeyi, kardiyembolik inmelerde tekrarlayan embolileri ve ileri derecede stenotik büyük damarlarda oklüzyonu önlemede etkin olduğu düşünülmektedir, literatürlerde bunu kanıtlayan çalışmalar yoktur. 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda ise erken dönem rekürren iskemik inme oranları daha düşük düzeylerde saptanmıştır. Kay ve arkadaşları bu oranı 10. günde %1,3 olarak rapor etmiştir. Benzer şekilde TOAST çalışmasında 7. günde %1,2, IST çalışmasında 14. günde %2,8- 4,9 ve CAST çalışmasında 28. günde %1,6-2,1 oranında tekrarlayan iskemik inme atakları bildirilmiştir. Kay ve arkadaşları, 1995 yılında 308 akut iskemik inmeli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, ilk 48 saatte başlanmak üzere, düşük doz nadoparin (düşük molekül ağırlıklı heparin), yüksek doz nadoparin ve plasebo tedavisi olmak üzere üç grup oluşturmuşlar. Altıncı ayda mortalite ve morbidite yönünden değerlendirildiğinde, düşük nadoparin tedavisi alan grupta %45, yüksek nadoparin tedavisi alan grupta %52 ve plasebo alan grupta %65 olarak saptamışlardır. Erken ölüm, komplikasyonlar ve hemoraji açısından ise fark izlenmemiştir. Rekürren iskemik atak oranları heparin alan grupta azalmakla beraber hemorajik inme oranlarının arttığı saptanmıştır (12,14). Birçok araştırma antikoagülan tedavinin erken rekürrensi önleme, kötüleşmeyi durdurma, prognozu düzeltme ve mortaliteyi azaltma yönünde bir yararı olmadığını göstermiştir. Başka bir uygulama intravenöz heparin vermeksizin oral warfarinle başlamaktır. INR 2,5-3 civarında tutulacak şekilde doz ayarlaması yapılır. Ancak orta serebral arter (MCA) geniş infarktlarında, yüksek doz veya bolus uygulaması ile antikoagülasyonda ve kontrol edilemeyen HT vakalarında morbiditede artış olduğu gözlenmektedir (14).

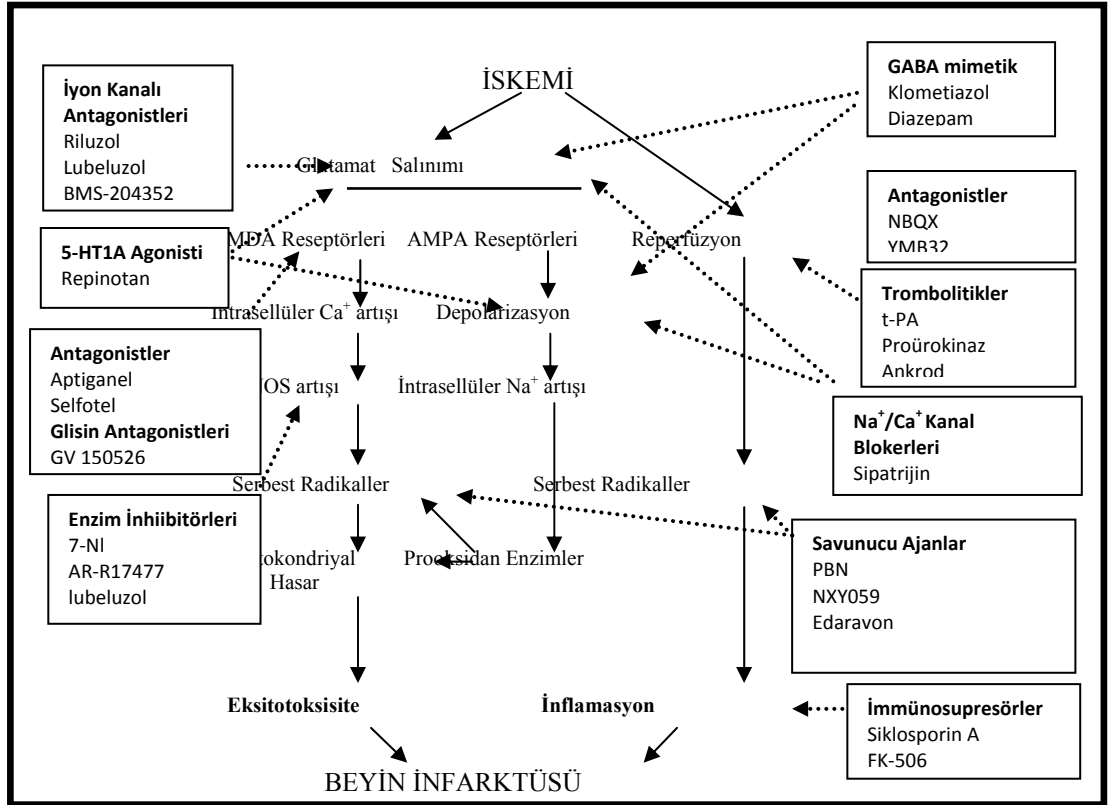
3) Akut iskemik inmede trombolitik tedavi: İskemik alanın reperfüzyonu akut inme tedavisinin temelini oluşturmaktadır (40). Trombolitik tedavinin amacı, beyin kan akımını tekrar sağlamaktır ve iskemik hasarı azaltmaktır. Trombolitik tedavide plazminojen aktivatörleri kullanılır. Bunlar plazminojeni plazmine çevirir, plazmin de fibrini parçalar. İnsan ve hayvanlarda trombolitik tedavi amacıyla kullanılan ajanlar çeşitli olup en sık denenmiş olanlar rtPA (recombinant tissue Plasminogen Activator), streptokinaz, ürokinazdır (12,14). Pek çok plazminojen aktivatörü ve zimojeni plazminojene çeviren aktif ajan plazmin, akut fokal serebral iskemi

tedavisinde sınırlı olarak kullanılabilir (41). En etkin girişimlerden birisi trombolitik bir ajan olan alteplazinin ilk 3 saat içinde kullanılmasıdır (42). NINDS rtPA (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rtPA Stroke Study, 1995) çalışmasında tedavi edilen her 100 kişiden 13 kişinin iyileştiğinin gösterilmesi, akut iskemik inme tedavisinde bir devrim sayılmış ve rtPA ilk spesifik terapötik ilaç kabul edilmiştir (14). Bu çalışmada belirlenebilen kesin iskemik inme kliniği olan erişkin hastalarda, ilk 3 saatte tedavi uygulanmıştır. İlk 36 saatte meydana gelen semptomatik kanama tPA grubunda %6,4 olup, bu plasebonun %0,6'lık oranından daha yüksektir (12). Trombolitik tedavi; semptomatik kanama riski yüksek olduğu halde, tedavi alan grupta ölüm ve bağımlılığının azalması, bu olumsuz etkiyi gidermiştir. Seçilmiş hastalarda akut dönemdeki yüksek kanama riski, uzun dönemde dizabilitenin azalması için göze alınabilir (14). rtPA tedavisi ile ilgili yapılan bir çalışmada rölatif risk azalması tedaviyle %44 iken, mutlak risk azalması %13, bir hastayı ölüm veya sakatlıktan kurtarabilmek için tedavi edilmesi gereken hasta sayısının 7 olduğu bulunmuştur (43). Yapılan retrospektif bir çalışmada, önceden antiplatelet tedavi almakta olan hastalarda intravenöz tromboliz sonrası parankimal kanama riski artmış bulunmuştur (44). İntravenöz rtPA uygulanmasını geniş ölçekli hasta gruplarında inceleyen NINDS (bölüm I ve II, tedavi penceresi 3 saat), ECASS (bölüm I ve II, tedavi penceresi 6 saat) ve ATLANTIS (bölüm A, zaman penceresi 6 saat, bölüm B, zaman penceresi 5 saat) çalışmalarının sonuçları ortak bir çerçevede incelendiğinde, intravenöz tedaviden elde edilecek faydayı belirleyen en önemli etkenin tedaviye başlama zamanı olduğu ortaya çıkmaktadır. İlk 90 dakika içinde başlanacak rtPA tedavisi ile üçüncü ayda sağlanacak fonksiyonel nörolojik düzelme, plaseboya oranla 2,8 kat daha fazla iken bu oran sırasıyla 91–180 dakika, 181–270 dakika ve 271–360 dakika arasında 1,55 (1,12–2,15), 1,40 (1,05–1,85) ve 1,15 (0,90–1,47) düzeylerine düşmektedir. ECASS III çalışmasının olumlu sonuçları trombolitik tedavi uygulanabilecek zaman aralığını 4,5 saate çıkartmıştır (42). İnme başlangıcı ve tedaviye başlama zamanı arasındaki süre arttıkça tedaviden elde edilen fayda düşmekle beraber, intraserebral kanama oranlarında süreyle ilişkili artış saptanmamaktadır (12). Hastaların ancak 1/3'ü 3 saat içinde hastaneye ulaşabilmektedir ki bu nedenle hastaların ancak %1-2 sine IV tromboliz uygulanabilmektedir (45). Plazmin hayvan modellerinde tromboliz ve kanama açısından plazminojen aktivatörlerinden daha fazla hemostatik güvenilirliğe sahiptir.

Plazminojen aktivatörleri tromboliz için etkin dozlarda kanama riski taşıırken, plazmin tromboliz için gerekli olan dozdan çok daha fazla dozlarda uygulandığında bile tolere edilmektedir (46).

4) Nöroprotektif tedavi: Nöroprotektif tedavide amaç spontan veya terapötik rekanalizasyon anına kadar riskli nöronların canlılığının korunmasını sağlamak ve reperfüzyon hasarını azaltmaktır. Akut iskemik inme tedavisinde yararı en çok gösterilmiş olan tedavi reperfüzyon girişimleri olduğuna göre, reperfüzyon tedavisine nöroprotektif ilaçları eklemek, iskemik hasara karşı her bir seçeneği tek başına uygulamaktan daha etkili olacak gibi görünmektedir (14).

Akut iskemik inme tedavisinde en yararlı tedavinin reperfüzyon girişimleri olduğu gösterilmiştir. Öyleyse, bu tedaviye nöroprotektif ilaçların eklenmesi iskemik hasarı önlemede her bir seçeneğin tek başına uygulanmasından daha etkili olabilir (14).



Şekil 3: İskemik kaskad mekanizmalarına etki eden nöroprotektif ajanlar (47)

Hayvan deneylerinde şekil 6'da sınıflandırılan bileşiklerin bir veya daha fazla mekanizma üzerindeki etkileri ile iskemi aracılı hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (47). Hayvan deneylerinde bir çok kimyasal maddenin nöroprotektif

etkisi incelenmiştir. Ancak hayvan deneylerinde nöroprotektif etkisi gösterilen bu ilaçların hiçbirisinin insanlarda kullanılabileceği ispatlanmamıştır. Bunun en önemli nedeni fokal veya global iskeminin pek çok mekanizmasının olması ve bahsi geçen ajanların bunlardan yalnızca bir tanesine etkili olmasıdır. Ajanlardan hiçbiri bir seferde veya hasardan sonra uygun zamanda tüm mekanizmaları etkileyemez (48).

NMDA reseptörü NR2B subtipine selektif etkili antagonist traksoprodilinin sıçan tromboembolik inme modelinde 2 saat içinde verildiğinde doza bağımlı olarak infarkt hacmini azalttığı gösterilmiştir (49).

Bir doz magnezyum sulfatın geçici iskemik atakta (50,51), MCA oklüzyon modelinde (52) ve emboli modelinde (53) nöroprotektif olduğu gösterilmiştir ancak 2400 hastayı içeren çok merkezli bir klinik çalışmada, magnezyum uygulamasının ölüm ve sakatlık oranlarını değiştirmedeği saptanmıştır (47).

Kitikolin hücre membran bütünlüğünün sağlanmasında temel ürün olan fosfotidil kolin üretiminde ara basamaktır ve iskemiye takiben gelişen lipid metabolizmasını azaltarak serbest yağ asitlerini ve serbest radikal oluşumunu azaltır (47,54). Rat global iskemi modelinde nörolojik defisiti azalttığı (55) ve rat geçici fokal iskemi modelinde (56) nörolojik defisiti azalttığı gösterilmiştir (47).

Metal şelatörü DP-b99' un; çinko, kalsiyum, demir ve bakır gibi iki değerli metallerin şelasyonunu ile oksidatif stres tarafından indüklenen kalp pain artışını invitro olarak azalttığı (57), MCA oklüzyon modelinde rat beyinde iskemiyle indüklenen matriks metalloproteinazlarını azalttığı ve infarkt boyutlarının küçülttüğü gösterilmiştir. Faz II klinik çalışmalarda gönüllü insanlarda iyi tolere edildiği belirtilmiştir (47).

Albuminin geçici iskemik atakta (58) ve kalıcı MCA oklüzyonunda infarkt büyüklüğünü azalttığı (59) gösterilmiştir. Geçici iskemiden sonra 4 saat içinde uygulanmalıdır. İlk 24 saatte inme hastalarına verildiğinde kardiyopulmoner yan etkilerin fazla olduğunu belirtilmiştir (60). Faz I çalışmalarında iyi tolere edildiği bildirilmiştir (61).

TNF α ve IL-1 β beyin hasarındaki inflamatuvar yanıtta major faktörlerdir ve her ikisine karşı gelişen antikorların serebral iskemideki hasarlanmayı azalttığı gösterilmiştir (62). Rekombinant IL-1 α antikor, inme hastalarının faz II çalışmalarında iyi tolere edilmiş olsa da TNF α antikorunun elde edilmesinde problem vardır (63). İnme hastalarında eritropoetinle ilgili çalışmalarda 3 günden fazla, günde

3 dozda verildiğinde etkin olduğu gösterilmiştir (64) ancak nöroprotektif dozlarda hematokriti arttırmaktadır.

Ebselen glutatyon peroksidaz benzeri aktivitede bir selenyum bileşiği enzimdir. Geçici iskemi rat modellerinde etkin olmakla beraber kalıcı fokal iskemide etkisiz olduğu gösterilmiştir (65). İnme hastalarının küçük bir grubunda etkisiz olarak değerlendirilip çalışmaları durdurulmuştur. Edaravon bir hidroksil radikal süpürücüsü olup 2005 yılında yapılan bir çalışmada subkortikal yapıları koruyamadığı gösterilmiştir (66). NXY-059 serbest radikal tutucu özelliği olan bir nitron derivativesidir. Bu bileşiğin ratlarda geçici iskemide ve MCA kalıcı oklüzyon modelinde (67) ratlarda ve tavşanlarda embolik inme modelinde subkortikal korumayı da içeren bir şekilde nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (68,69). Kalıcı fokal iskemiden 4 saat sonra (67) ve geçici iskemiden 5 saat sonra verildiğinde istatistiksel olarak nöroprotektif anlamlı etkinliği olduğu bildirilmiştir (70).

2.2. Nitrik Oksit

NO su ve yağda çözülebilen, yarı ömrü birkaç saniye olan bir serbest radikaldir (2). NO'nun kan basıncı, vasküler tonus, geçirgenlik ve sinaptik transmisyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda düzenleyici rolü vardır. L- Argininden NOS aracılığı ile sentezlenir. NOS enziminin üç izofomu mevcuttur: nöronal (n- NOS), indüklenen (Tip II) ve endotelial (Tip III). Nöronal ve endotelial formu yapısal olarak mevcut olup Ca^{+2} /kalmoduleline bağımlıdır ve hücre içindeki Ca^{+2} artışı ile aktive olur. İndüklenen formu ise hücre içi Ca^{+2} değişikliklerinden bağımsızdır ve sitotoksik inflamatuvar yanıtı oluşturan NO' i sentezler (33). Serebral otheregülasyonla en kuvvetli ilişkili olanı endotelial NOS (e-NOS)' tır. e-NOS tarafından üretilen NO serebral iskemi sırasında nöroprotektiftir, e-NOS sadece vasküler dilatasyon sağlamaz aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu arttırarak inme sonrası arteriogenezi arttırır. e-NOS tarafından üretilen NO, iskemik hasarı iyileştirebilir. n-NOS geni çıkartılmış sıçanlarla yapılan hayvan deneyinde, NO üretimi olmadığından dolayı, iskemi ve reperfüzyon sırasında akut iskemik hasarın baskılanabileceği gösterilmiştir (71). İskemide fazla n-NO üretimi nörotoksik iken, e-NO bölgesel kan akımını arttırarak ve diğer hemodinamik faktörler üzerine

etki ederek beyin dokusu üzerine koruyucu rol oynamaktadır (33). NO'in bu dual etkisinin iskemik serebral hasarda, doku hasarı ve izoenzim formlarının evresine bağlı olabileceği düşünülmektedir. İskemi uygulandıktan sonraki erken evrede NO, e-NOS ve n-NOS tarafından sentezlenir, iskemiden sonraki dönemlerde i-NOS tarafından sentezlenmektedir. NO metabolitleri iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkilidir, superoksit anyonu ve NO'in hücre kültürlerinde iskemi/reoksijenizasyon hasarındaki rolü gösterilmiştir (72). Serebral iskemi sırasında eksitatör aminoasitlerle NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasının, n-NOS yoluyla NO'in aşırı üretimine neden olarak hücre ölümünü başlattığı ve NOS inhibisyonunun kortikal hücre kültürlerinde glutamatla indüklenen nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (72). İskemik ve normal beyinlerde L-Arginin infüzyonunun, NO aracılı mekanizmalarla pial damarlarda genişlemeye yol açarak rezidüel kan akımını arttırdığı ve infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (73). Kolesterol düşürücü olarak yaygın şekilde kullanılan HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) Redüktaz inhibitörleri yani statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak iskemik hayvan modellerinde koruma sağladığı gösterilmiştir. Bu etkilerini e-NOS'ı arttırarak yaptıkları düşünülmektedir (74). Nonspesifik NOS inhibitörü olan L-NAME'nin, ratlarda MCA oklüzyonunda infarkt boyutlarını azalttığı ispatlanmıştır. Bu bulgular, iske miyle indüklenen nöronal hasarın bir aşamada NO tarafından geliştiği ve özellikle nörotoksisiteden sorumlu olan n-NO'un üretiminin inhibisyonu yoluyla azaltılabileceğini göstermektedir (72). Fokal iskemi havyan modellerinde selektif n-NOS inhibitörü 7-nitroindazol (7-NI) ve ARL 17477'nin infarkt boyutlarını küçülttüğü gösterilmiştir (71).

2.3.Antioksidan Sistem

Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler.

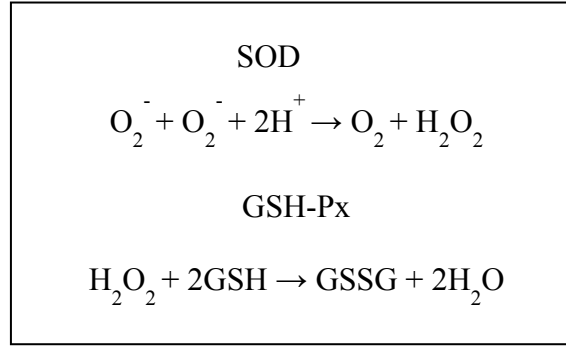
1. Temizleme etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki SOD, KAT, GSH-Px, Glutasyon redüktaz, Glutasyon S-Transferaz gibi enzimler tarafından yapılır.

2. Baskılama etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler (A,C,E) ve flavonoidler tarafından yapılır.

3. Onarma etkisi

4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (36).

Antioksidan sistemde yer alan antioksidan enzimler SOD, KAT, GSH-Px, Glutatyon redüktaz, Glutatyon S-Transferazdır.



Şekil 4. Antioksidan enzim olan SOD ve GSH-Px'in etki mekanizmaları

1-*Süperoksid Dismutaz*: Üç tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksid radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD' dir. Metalloprotein olan SOD bir süperoksid molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H_2O_2 'e indirger (36). (Şekil 4)

2-*Katalaz*: Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. Katalaz SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutatyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur.

3-*Glutatyon peroksidaz*: Redükte glutatyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (şekil 4).

Glutasyon peroksidaz yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (36).

4-*Glutasyon Redüktaz*: Yükseltgenmiş glutasyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir (36).

5-*Glutasyon S-Transferaz (GST)*: Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen, GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir (36).

6-*Endojen Non-Enzimatik Antioksidan Ajanlar*: Askorbik Asit (Vitamin C), Vitamin E (α -Tokoferol) ve Vitamin A (β -Karoten) dır (36).

2.4. Lipid Peroksidasyonu

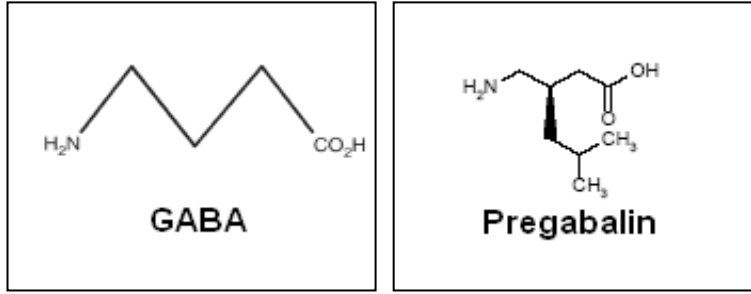
Serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan, böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır. Aldehitler lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en toksik ürünlerdir. Malondialdehit (MDA) non-enzimatik oksidatif lipid peroksidasyonunun sonucu oluşur ve peroksidasyonun son ürünüdür (21).

2.5. NMDA Reseptörleri

Eksitator aminoasitler normalde sinir iletiminden sorumlu oldukları halde, nörotoksisitenin de potansiyel kaynağıdır. NMDA reseptörleri hipokampus, striatum, talamus ve serebral ve serebellar korteksde bulunur. NMDA reseptörlerinin farklı subünitleri mevcuttur. Bu subünitler değişik beyin bölgelerinde daha yoğun konsantrasyonlarda yer almakta ve canlılığın gelişim evresine göre de farklılıklar gösterebilmektedir (34). Literatürler NMDA reseptörlerinin iskemide rolü olduğunu göstermektedir (75). Yakın zamanlarda iskemik hücre ölümünü önlemek amacıyla kullanılmıştır ve *invivo*, *invitro* deneylerde iskemi oluşumundaki etkileri gösterilmiştir (75). NMDA reseptörleri NR1 (a-h), NR2 (A-D) ve NR3 (A-B) subünitlerinden oluşmaktadır. NR1 ve NR3 subünitleri; glisin veya D-serin

bağlarken, glutamat veya diğer eksitator aminoasitleri bağlamaz. Sadece NR2 subünitinin eksitator aminoasitler için bağlanma bölgesi vardır. Bu nedenle fonksiyonel NMDA reseptörü en az bir NR2 subüniti içermelidir (76).

2.6. Pregabalin



Şekil 5. GABA ve Pregabalin'in moleküler yapısı (7).

Pregabalin (S-(+)-3- İsobutyl GABA veya (S) -3-(aminometil)-5 metilhekzanoik asid) ve gabapentin (1-(aminometil) siklohekzan asetik acid) GABA 3- karbon pozisyonunun alkil derivativesidir.

Pregabalin spesifik olarak sinir terminallerinde depolarizasyonla indüklenen Ca^{+2} akışını düzenleyen VSKK α -2-delta (δ) Tip 1 ve 2 subünitlerine bağlanır (77). Pregabalinin VSKK kanallarına bağlanması yapılarını değiştirir, sinir terminaline Ca^{+2} akımını azaltır (9). Bu ilaçların küçük dozlarında bile presinaptik P/Q tipi VSKK kanallarından Ca^{+2} akımı inhibisyonu olur (78). Epilepsi gibi nöronlarda anormal ateşlenme olduğunda veya nöropatik ağrıdaki gibi nöronlar hasarlanmış olduğunda, bu nöronlar aşırı uyarılmış hale gelir ve uyarılmış nöronlarda Ca^{+2} iyon akışı norepinefrin, glutamat ve substans P gibi pek çok nörotransmitterin salınımına neden olur. Pregabalin eksitator nörotransmitterlerin salınımını azaltır, postsinaptik nöronların uyarılmasını azaltarak nöronları normal fizyolojik duruma getirir. Böylece hipereksite nöronlarda eksitator nörotransmitterlerin salınımını düzenleyerek normal fizyolojik duruma dönmelerini sağlar (7).

Pregabalin lineer bir farmakokinetik gösterir. Alımdan 1 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ve 24-48 saat kararlı konsantrasyona sonra ulaşır. Oral biyoyararlanımı %90'dan fazladır, yarılanma ömrü 6,4 saattir ve dozdan ya da

tekrarlayan ilaç uygulamalarından bağımsızdır. Dozla orantılı farmakokinetiği pregabalinin klinik uygulamalarında güvenli olduğunu göstermektedir. Emilimi yemeklerle ilişkili değildir. Rat, fare ve maymunlarda kan beyin bariyerini hızla geçtiği gösterilmiştir (79). Pregabalin ratlarda yüksek oral biyoyararlanıma (%83) sahiptir; önemli oranda metabolize olmamakta, maksimum etkisini 2–4 saatte göstermektedir. Pregabalinin ratlara oral uygulamasından sonra maksimum plazma ilaç konsantrasyonu, artan dozlarla lineer bir tarzda yükselmiştir. Ratta pregabalin farmakokinetiği doza bağımlı olarak gözlenmiştir (7). İnsanlarda %2'nin altında metabolize olur (79). Yaklaşık %98'i yıkılmadan böbrek yoluyla atılır. Plazma proteinlerine bağlanmaz (77). Hepatik metabolizması yoktur ve sitokrom P450 gibi karaciğer enzimlerini inhibe etmez. Plazma proteinlerine bağlanmadığından ve metabolize olmadığından ilaç ilaç etkileşimlerine neden olmaz. Lamotrijin, fenobarbital, topiramet ve valproik asit ile birlikte kullanıldığında farmakokinetiklerini etkilemediği gösterilmiştir (79).

Pregabalinin spinal kord hasarında nöroprotektif olduğu ratlarda gösterilmiştir (6). Çalışmamızda pregabalinin ratlarda karotis arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi reperfüzyon modelinde nöroprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Nöroprotektif etki NO, NMDA reseptörleri ve antioksidan enzim düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir

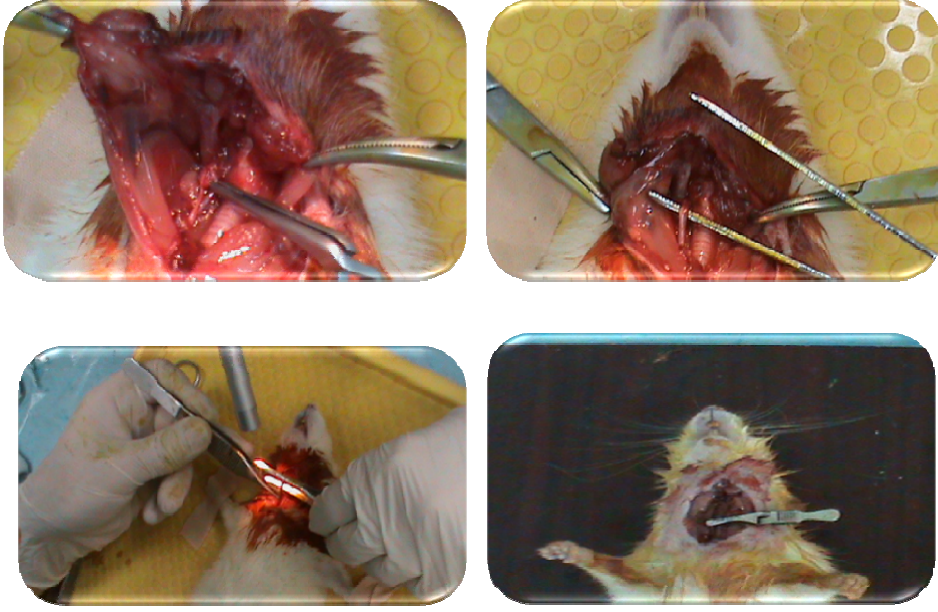
3. MATERYAL-METOD

Bu çalışmada Wistar cinsi toplam 36 adet erkek rat kullanılmıştır. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (23 °C) koşullarında yaşatılmışlardır. Tüm gruplar yeteri kadar su ve yem (Korkutelim Yem, Standart Sıçan Yemi) ile beslenmişlerdir. Ratlar tablo 4’ de gösterildiği şekilde 6 gruba ayrılmıştır.

Tablo 4. Deney grupların sınıflandırılması

GRUPLAR	
Grup I (n=6)	Kontrol
Grup II (n=6)	Pregabalin
Grup III (n=6)	İskemi
Grup IV (n=6)	Pregabalin+İskemi
Grup V (n=6)	İskemi+Reperfüzyon
Grup VI (n=6)	Pregabalin+İskemi+Reperfüzyon

İkinci, 4. ve 6. gruba Pregabalin 50mg/kg/gün dozunda günlük tartılıp distile suda çözdürülerek herbir sıçana 1 ml hacimde olacak şekilde, 2 gün süresince oral gavaj ile uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak kontrol grubuna da distile su yine oral gavaj ile 2 gün verilmiştir. İlaç uygulaması sonunda intraperitoneal olarak uygulanan % 10’luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) ve % 2’lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında sağ internal karotis arter 3, 4, 5 ve 6. gruplarda buldog klemp ile oklude edilerek 30 dakika boyunca iskemiye maruz bırakılmıştır. Beşinci ve altıncı gruba 30 dakika oklüzyon ile iskemi oluşturulduktan sonra klemp açılarak 20 dakika reperfüzyon uygulanmıştır (Resim 1).



Resim 1. Deney sırasında uygulanan sağ internal karotis arter oklüzyon aşamaları.

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları alınmıştır. Soğuk fosfat tamponuyla ıslatılmış filtre kağıtları buz paketleri üzerine konarak hipokampüs çıkartma düzeneği oluşturulmuştur. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzenek üzerinde her bir kafatasında hipokampüs ve frontal lob çıkarılarak önceden hazırlanmış 50 mM fosfat tamponu içeren ependorf tüplere konulmuş ve analizin yapılacağı tarihe kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.1. Hipokampüs ve Frontal Lob Örneklerinin Homojenizasyonu

Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampüs örnekleri ve frontal lob örnekleri tartılmıştır. Frontal lobların 5 katı fosfat tamponuyla homojenize edilmiştir. Yeterli protein konsantrasyonunu sağlamak amacıyla 3 hipokampüs 1 örnek oluşturacak şekilde birleştirilmiş ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Frontal lob örnekleri tek tek tartılmış, 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Her iki dokuda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede parçalanmış ve sonikasyon işlemi (UW-2070 Bandeun Electronic, Almanya) ile homojenizasyon tamamlanmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de (Eppendorf 5415-

R, Almanya) 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapılmıştır (80). Son olarak süpernatantları yedeklenerek çalışılınca kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. SDS-PAGE Yöntemi

Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında Lowry yönteminin esas alındığı DC Protein Assay (Bio-Rad, Amerika) kullanılarak protein tayini yapılmıştır (84). % 7,5’lik lower jel ve % 4’lük upper jel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde, doku homojenatı sample buffer’la 1/1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır (81).

3.3. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler elektroforez işlemi ile protein bantlarına ayrılmıştır ve daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alınmıştır. Transfer prosedürü sonrası anti NR2A, anti NR2B ve anti β-aktin içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletilmiştir. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000 MM cihazı kullanılarak taranmıştır.



Şekil 6. Western Blot yöntemi ile elde edilen β- aktin bantları

Normal NMDA 2A ve 2B subunitleri Şekil 10' da gösterilen β -aktin bantları ile oranlanarak normalize edilmiştir (82). Herbir kuyucuğa eşit miktarda ekim yapılmıştır. Koyu olan β - aktin bantları protein ekspresyonu ile uyumlu olarak koyu gözlenmektedir.

3.4. Superoksit Dismutaz (SOD)

Frontal lob örnekleri Cayman marka ticari kit ile kolorimetrik yöntemle çalışılmıştır. Kit, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından oluşturulan superoksit radikallerini saptamak için tetrazolium tuzu kullanmaktadır. Bir ünite SOD, superoksit radikalının %50'sinin dismutasyonunu sağlayan enzim miktarıdır. Bu kit ile üç tip SOD (Cu/Zn, Mn ve FeSOD) ın tamamının ölçümü sağlanmıştır. Sonuçlar U/gr protein olarak verilmiştir.

3.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Frontal lob örnekleri Cayman marka kolorimetrik yöntemle ölçüm yapan kit ile çalışılmıştır. GSH-Px aktivitesi glutasyon redüktazın da katıldığı iki aşamalı bir reaksiyon ile indirekt olarak ölçülmüştür. Okside glutasyon (GSSG), hidrojen peroksidin GSH-Px tarafından redüklenmesi ile oluşur ve ikinci reaksiyonda glutasyonun tekrar redüklenmesi için glutasyon redüktaz ve NADPH kullanılır. Sonuçlar nmol/dk/gr protein olarak verilmiştir. NADPH'ın NADP⁺'ya oksidasyonu 340nmde absorbans düşüşü ile birliktedir. GSH-Px aktivitesi 340 nmdeki absorbans düşüşü ile doğru orantılıdır.

3.6. Katalaz (KAT)

KAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışılmıştır (83). KAT hidrojen peroksidin (H₂O₂) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Çalışmada KAT aktivitesi, H₂O₂ konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle tayin edilmiştir. KAT tarafından

parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edilmiştir. KAT aktivitesi U/gprotein olarak verilmiştir.

3.7. Tiobarbitürik Asid Reaktif Ürünü (TBARS)

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılan TBARS, Cayman marka kolorimetrik yöntemle ölçüm yapan kit ile çalışılmıştır. MDA ve TBA'nın yüksek sıcaklıkta (90-100 °C) reaksiyonu ile MDA-TBA kompleksi oluşur. Asidik ortamda 530 nmde kolorimetrik ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{M/g}$ protein olarak verilmiştir.

3.8. Nitrat/ nitrit Ölçümü (NO)

Cayman'ın nitrat/nitrit kolorimetrik kiti total nitrat/nitrit konsantrasyonunun basit iki basamaklı bir reaksiyon ile ölçümünü sağlar. İlk basamakta nitratın nitrite dönüşümünde nitrat redüktaz enzimi kullanılır. İkinci basamakta Griess reaktifinin eklenmesi ile nitrit koyu mor azo bileşiğine dönüşür. Oluşan azo kromofor bileşiğinin 540nm'de absorbansının alınmasıyla nitrit düzeyi (NO_2^-) saptanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 18.0 (Statistical Packet for Social Signs) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Grupların verileri ortalama ve standart sapma dağılımları ile gösterilmiştir. Gruplar arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. %95 Güven Aralığında % 5 hata payı dikkate alınarak $p<0,05$ anlamlılık değeri olarak alınmıştır. Sonuçların anlamlılığının değerlendirilmesinde Bonferroni düzeltmesi uygulanarak anlamlılık değeri bu kez $p<0,01$ kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular:

4.1.1. Western Blot Bantları

B-aktin bantları eşit protein ekimi ve örnek transferini standardize etmek amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen bant yoğunlukları NR2A ve NR2B reseptörlerinin subüniti kendine ait ile oranlanarak normalize edilmiştir.



Şekil 7. NR2A ve NR2B reseptörüne ait bantlar

* Birinci bant: İskemi +Reperfüzyon,
 * İkinci bant: İskemi,
 * Üçüncü bant: İskemi + Pregabalin,

* Dördüncü bant: İskemi+Reperfüzyon+Pregabalin
 * Beşinci bant: Pregabalin,
 * Altıncı bant: Kontrol

Bu β -aktin bantlarına göre NR2B reseptör ekspresyonu çalışmamızla uyumlu olarak 1-4 gruplarında artmış ve koyu renkle gösterilmiştir. NR2A'da ise çalışmamızla ilgili herhangi bir uyum bulunamamıştır.

Hipokampus homojenatları western blotting yöntemiyle çalışılmıştır. Kontrol grubu protein ekspresyonu ortalaması 100 kabul edilmiştir. Diğer grupların ekspresyonları kontrol grubuna göre % oranlarında değişiklik olarak aktarılmıştır.

4.1.2 Oksidatif Stres Ürünleri

Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusunun frontal lobundan ölçülen TBARS, NO, SOD, GSH-Px ve KAT düzeylerinin ortalamaları tabloda verilmiştir.

Tablo 5: Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusu frontal lobu oksidatif stres parametreleri

GRUPLAR	TBARS (μ molar/grp rotein)	NO (μ molar/ grprotein)	GSH-Px (nmol/ grprotein)	SOD (U/grprotein)	KAT (kU/gr protein)
Kontrol	11,09 \pm 0,5	0,74 \pm 0,3	46,89 \pm 1,8	2,53 \pm 0,1	7,40 \pm 0,4
Pregabalin (n=6)	11,39 \pm 1,1	0,55 \pm 0,2	49,23 \pm 1,8	2,03 \pm 0,2	7,46 \pm 0,4
İskemi (n=6)	25,12 \pm 2,9*	6,70 \pm 1,4*	33,38 \pm 3,7*	1,90 \pm 0,1*	3,88 \pm 0,3*
Pregabalin + İskemi (n=6)	23,16 \pm 2,2	1,88 \pm 0,2*	34,26 \pm 2,4	2,47 \pm 0,3	4,66 \pm 0,3
İskemi+ Reperfüzyon (n=6)	23,84 \pm 1,2*	4,49 \pm 0,7*	35,05 \pm 3,0*	2,25 \pm 0,3	5,57 \pm 0,5
Pregabalin + İskemi + Reperfüzyon (n=6)	17,75 \pm 0,9*	2,06 \pm 0,4*	48,51 \pm 1,1*	2,54 \pm 0,2	6,77 \pm 0,7

Bu tabloda 6 gruba uygulanan cerrahi müdahale ve medikal tedavi sonrası ölçülen ve oksidatif stres göstergesi olan TBARS ve MDA ile antioksidan enzimler olan GSH-Px, SOD ve KAT yer almaktadır. Uygulanan iskemi ile TBARS ve MDA seviyelerinde artma ve GSH-Px, SOD ve KAT seviyelerinde ise kullanıma bağlı azalma beklenmektedir.

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda beyin dokusunda oksidatif hasar göstergesi olan TBARS seviyesinde iskemi ve iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.01$). TBARS düzeylerinde; iskemi+pregabalin grubunda iskemi grubuna göre belli bir miktar azalma gözlenmiştir fakat anlamlı değildir. Buna karşın pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunun sadece iskemi + reperfüzyon grubuna göre TBARS düzeylerinde anlamlı olarak azalma gözlenmiştir ($p < 0.01$).

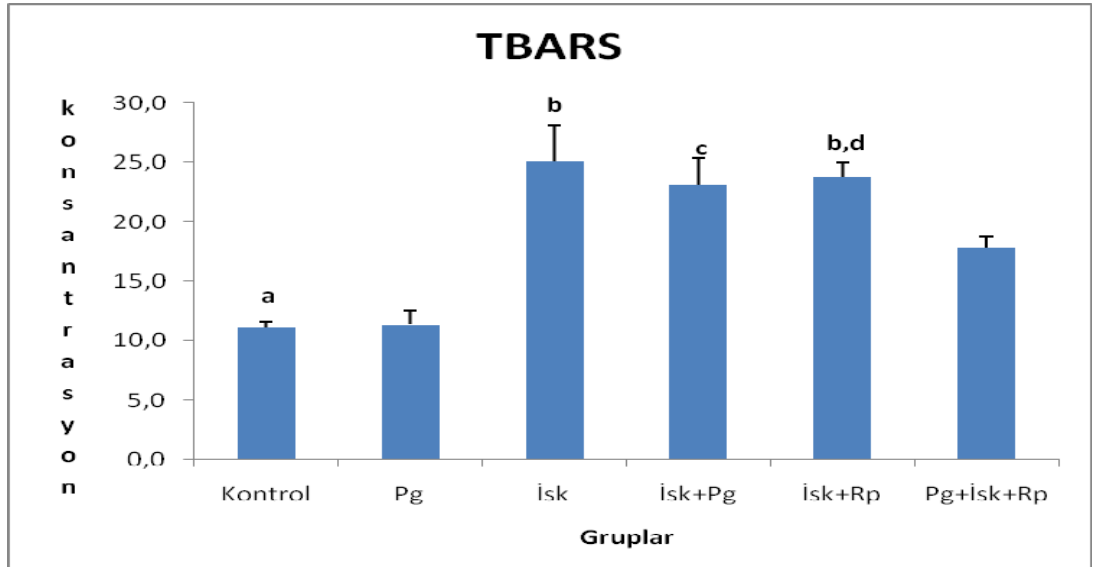
NO seviyesinde; iskemi ve iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.01$) İskemi + pregabalin grubunda sadece iskemi uygulanan gruba göre NO'te anlamlı olarak azalma

gözlendiği (p<0.01). NO düzeyleri pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunda, sadece iskemi + reperfüzyonlu gruba göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.01).

Antioksidan enzim olan GSH-Px seviyesi her iki hasar oluşturulan grupta da, enzimin kullanıma bağlı anlamlı olarak azalmıştır (p<0.01). Pregabalin+iskemi grubunun GSH-Px seviyesi, iskemi grubuna göre belli bir artış göstermiştir fakat anlamlı değildir. Pregabalin + iskemi + reperfüzyonlu grupta ise sadece iskemi + reperfüzyonlu gruba göre GSH-Px değerleri anlamlı olarak artmıştır (p<0.01).

SOD enzim seviyesinde sadece iskemi uygulanan grupta anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0.01). İskemi+reperfüzyon grubunun SOD seviyelerinde, kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlense de anlamlı değildir. Tablodan anlaşılacağı üzere pregabalin uygulaması SOD seviyelerini bir miktar arttırmış olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır (p>0.05).

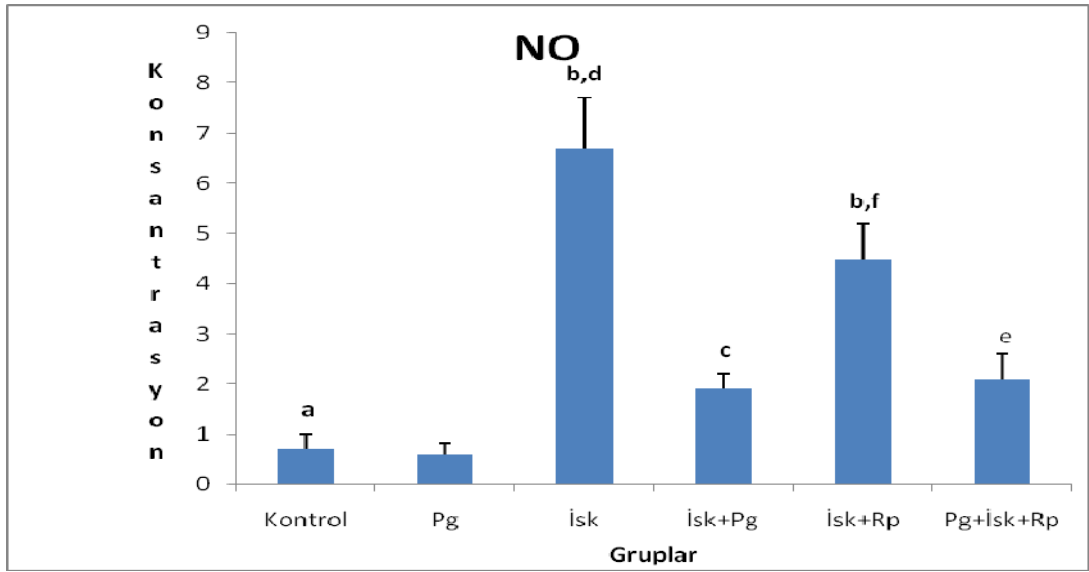
KAT enzimi seviyesi de SOD enziminde gözlendiği gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iskemi uygulanan grupta anlamlı düzeyde azalmıştır (p<0.01). İskemi+reperfüzyon grubunun KAT seviyelerinde, kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlense de bu fark anlamlı değildir. Pregabalin + iskemi grubunda iskemi grubuna göre bir artış ve pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunda iskemi + reperfüzyon grubuna göre KAT seviyelerinde bir artış olmuştur fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05) (Tablo 5).



Şekil 8. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen TBARS düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

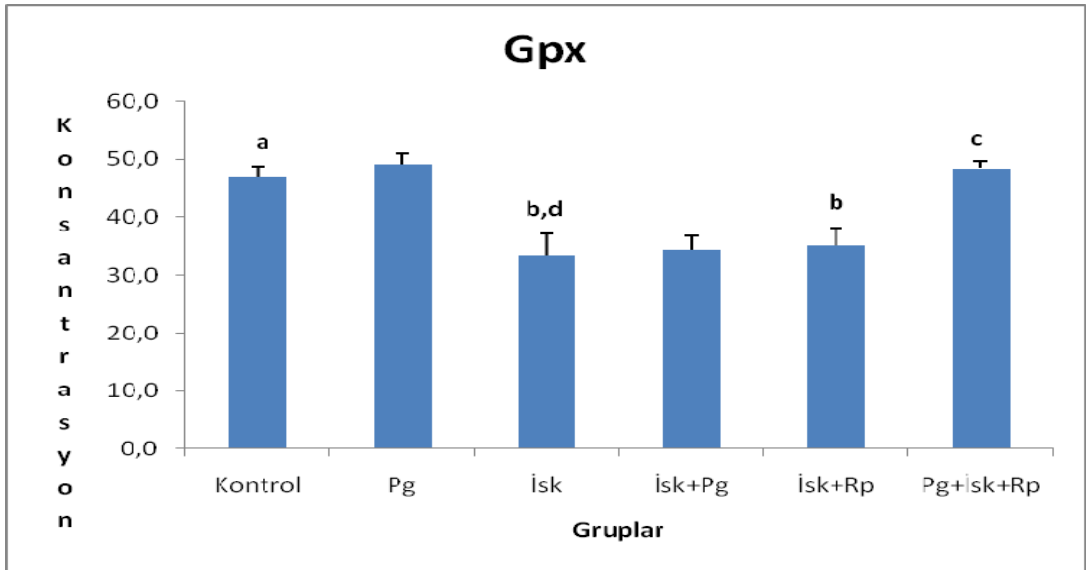
'b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı

'c', 'd' ye göre istatistiksel olarak anlamlı



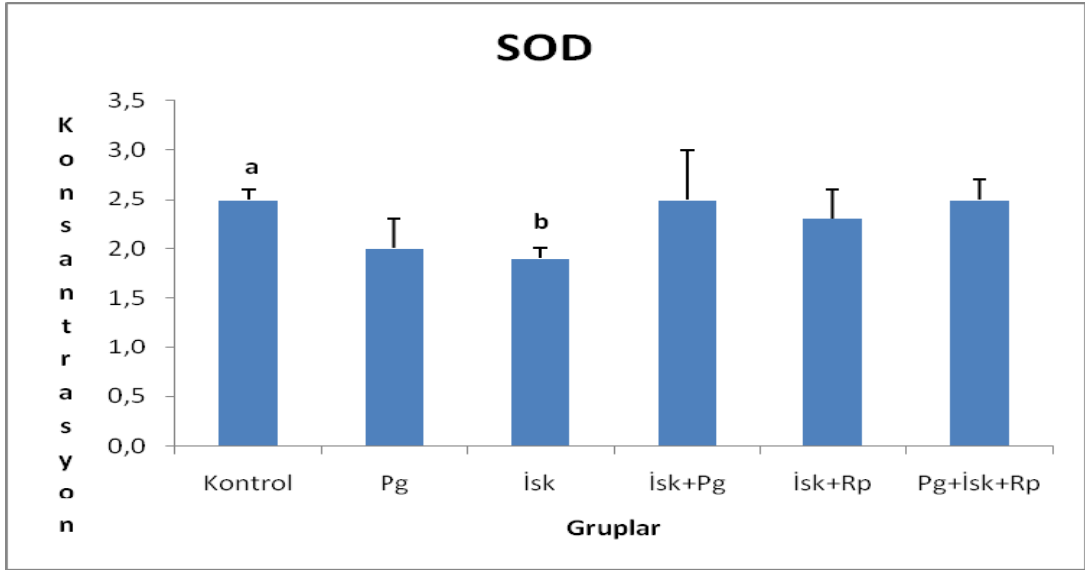
Şekil 9. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NO düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

'b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı,
'c', 'd' ye göre istatistiksel olarak anlamlı
'e', 'f' ye göre istatistiksel olarak anlamlı



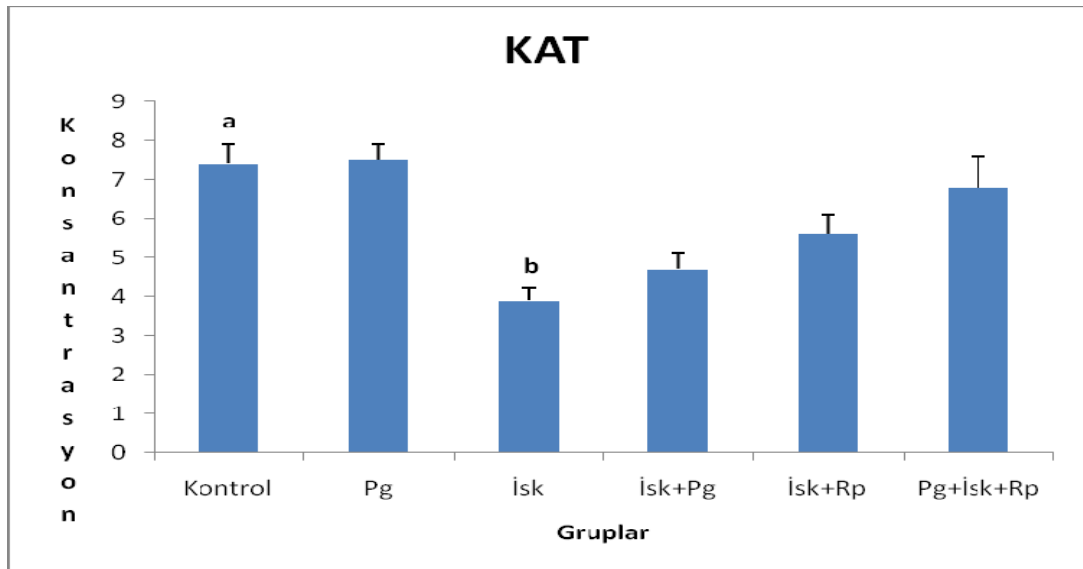
Şekil 10. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen GSH-Px düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

'b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı,
'c', 'd' ye göre istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 11. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen SOD düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

'b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 12. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen KAT düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı,

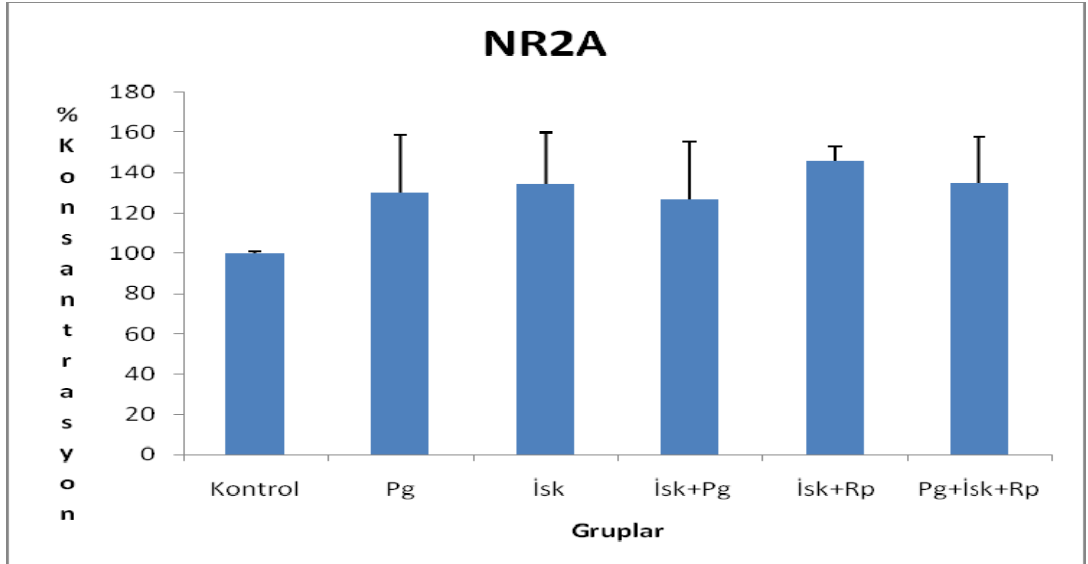
4.1.3 NMDA Reseptör Düzeyleri

Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusunun frontal lobundan ölçülen NR2A ve NR2B reseptör düzeylerinin aritmetik ortalamaları tabloda verilmiştir.

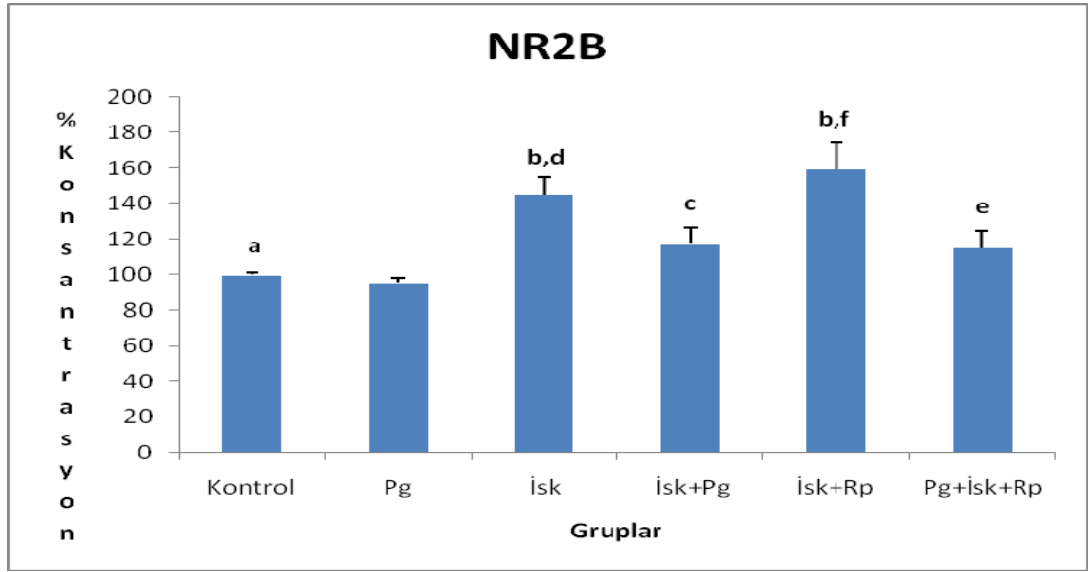
Tablo 6: Deney ve kontrol grubuna ait beyin dokusunun frontal lobundan ölçülen NR2A ve NR2B reseptör düzeylerinin aritmetik ortalaması

Gruplar	NR2A	NR2B
Kontrol	100	100
Pregabalin	129,9±28,9	95±3.4
İskemi	134.4±25,7	144,8±10,4*
Pregabalin + İskemi	126,8±28,4	117,3±9,3*
İskemi+ Reperfüzyon	145,9±6,9	159,3±15,6*
Pregabalin + İskemi + Reperfüzyon	135,1±22,8	115±9,7*

Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda beyin dokusunda NMDA reseptörlerinden NR2A ekspresyonunda gruplar arası anlamlı bir değişiklik yoktur. İskemi grubundaki NR2B reseptör ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Pregabalin + iskemi grubunda NR2B reseptör düzeyleri, iskemi grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır ($p<0.01$). İskemi + reperfüzyon grubunda NR2B reseptör düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.01$). Pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunda, iskemi + reperfüzyon grubuna göre NR2B reseptör düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.01$).



Şekil 13. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NR2A reseptör düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması



Şekil 14. Beyin dokusu frontal lobundan elde edilen NR2B reseptör düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması b', 'a' ye göre istatistiksel olarak anlamlı, 'c', 'd' ye göre istatistiksel olarak anlamlı 'e', 'f' ye göre istatistiksel olarak anlamlı

5-TARTIŞMA VE SONUÇ

Beyini besleyen damarlardaki tıkanıklık sonucu meydana gelen inme, önemli bir ölüm ve sakatlık nedenidir. Kan akımının kesilmesini takiben saniyeler-dakikalar içinde infarktın çekirdek bölgesinde, membran hasarı ve nöronal ölümle sonuçlanan iskemik kaskad başlar (84). Akut iskemik inme ve iskemi sonrası reperfüzyon, mitokondride oluşan aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin üretilmesi nedeni ile oksidatif strese neden olur (84,85). Oksidatif stres prooksidan maddelerin indirgenebilme özelliğinin antioksidan mekanizmaları aşması sonucu meydana gelir (86). Nöronlar rölatif olarak düşük endojen antioksidanlara sahip olduğundan serbest radikallere diğer organlara göre daha dayanıksızdır (87). İskemi ve reperfüzyonla oluşan serbest oksijen radikallerinin ortamdan uzaklaştırılmaları amacıyla pek çok bileşik üretilmiş ve hasar azaltılmaya çalışılmıştır. Ancak iskemi sonrası nöronları korumak amacıyla kullanılan nöroprotektif ajanlar hala umut verici değildir. Denenen 1000 den fazla ajanın çoğu hayvan deneylerinde etkin bulunmuş, ancak 100 den fazla yapılan klinik çalışmada insanlarda etkinlik gösterilememiştir (88).

Reperfüzyon sırasında moleküler oksijenin, serbest oksijen radikalleri ve peroksida indirgenmesi kolaylaşmaktadır. Çalışmalarda SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin varlığında ratların iskemi ve reperfüzyon hasarına dirençli olduğu, bu enzimlerin yokluğunda ise ağır inme hasarına uğradığı gösterilmiştir. Buna dayanarak antioksidan ajanlar, geçici iskemik atak sonucu nörodejenerasyon için değerli bir azaltıcı olabilir (89).

Bazı antiepileptik ilaçlar inme sonrası gelişen hücre ölümünü azaltabilecek nöroprotektif etkilere sahiptir (5). Bir GABA 3- karbon pozisyonunun alkil derivesi olan pregabalin; epileptik nöbetler, postherpetik nevralji, diyabetik periferik nöropati, anksiyete ve fibromyalji tedavisinde etkin ve güvenli bir tedavi aracıdır. Pregabalin dışında GABA'nın üçüncü karbon pozisyonunda alkil derivesi olan bir diğer antiepileptik gabapentindir. Pregabalin ve gabapentinin epilepsi tedavisinde etki mekanizması benzerdir, ancak pregabalin gabapentinden daha potent olarak VSKK'na bağlanır (10). Pregabalinin ratlarda yapılmış çalışmada spinal iskemi sonrası nöroprotektör olduğu gösterilmiştir (6). Gabapentinin rat hipoksik ve

immobilizasyon stres modellerinde oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (11). Pregabalinin yapısı ve etki mekanizması gabapentinle benzer olduğu için hipokside oksidatif stresi azaltılabileceği ve nöroprotektif olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızda bu nedenle pregabalinin iskemi ve reperfüzyon sırasındaki nöroprotektif etkileri araştırılmıştır.

Nöroprotektif ilaçlar iskemik dokuda irreversibl hasara uğramamış bölgeleri etkiler. Reperfüzyon tedavileriyle nöroprotektif ajanların birlikte kullanılması sinerjistik etkiyle iskemik doku kurtarımını arttırabilir. Çalışmalar inme tedavisinde hedefin penumbra alanı olduğunu göstermektedir (90). İskemik penumbra santral iskemik çekirdek alanı bir halka ile çevreleyen beyin dokusudur. Bu bölge kanlanması bozulmuş ancak normal hücrel ve fonksiyonel işlevlerini yürüten bir alandır. İskemik penumbra kurtarımını kollateral dolaşım, reperfüzyon ve rekanalizasyon gibi pek çok faktör etkiler (91). Ancak iskemik dokunun normal fonksiyonunun tamiri için kritik olan reperfüzyon, paradoks olarak sekonder hasarlanmayla sonuçlanabilir (2).

İnme tedavisinde en önemli hedeflerden biri tıkanmış arterin rekanalizasyonu ile beyin dokusunu kurtarmak için kan akımının sağlanmasıdır. Ancak oksidatif stres reoksijenizasyon sırasında hızla gelişebileceğinden reperfüzyonun zararlı etkisi olabilir. İskemi-reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri biyolojik membranlardaki doymamış yağlarla reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA' yı oluşturabilir. MDA doku hasarının biyolojik işareti olabilir ve oksidatif hasarı gösterebilir. Pek çok akut inme hastasında MDA düzeylerinde artış gösterilmiştir (92). Bizim çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olarak MDA seviyesinde iskemi ve iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu iskemi ile oluşturulan doku hasarını göstermektedir. MDA düzeyinde iskemi+pregabalin grubunda iskemi grubuna göre belli bir miktar azalma gözlenmiştir, fakat bu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Buna karşın pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunun sadece iskemi + reperfüzyon grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı olarak azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu da bize iskemi ve reperfüzyon ile meydana gelen hasarın pregabalin uygulanması ile azaltılabileceğini göstermektedir. Bu sonuçtan yola çıkılarak pregabalinin oksidatif stresi azalttığı düşünülebilir. Pregabalin+ iskemi grubunun

MDA düzeyinin sadece iskemi uygulanan grubun MDA düzeyinden anlamlı düşük olmamasına karşın Pregabalin+ iskemi+ reperfüzyon grubunun iskemi+reperfüzyon uygulanan grubun MDA düzeyinden anlamlı olarak düşük olması reperfüzyon hasarının şiddetine bağlı olabilir.

İskemi nitrik oksit sentetazı (NOS) aktive ederek NO miktarını artırır ki, NO superoksit ile birleşerek etkili bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Reperfüzyonu takiben peroksinitrit, NO ve superoksit miktarlarında tekrar artış olur (93). Çalışmamızda NO seviyesinde iskemi ve iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu bulgu iskemi ve sonrasında uygulanan reperfüzyon sırasındaki NO artışını destekler bir bulgudur. İskemi sonrasında reperfüzyon uygulanan grupta iskemi grubuna göre NO düzeylerinde anlamlı bir düşme gözlenmiştir. Bu durum uygulanan reperfüzyonun iskiyle meydana gelen hasarı azalttığını düşündürür. NO düzeyindeki azalma reperfüzyon sırasında NO in peroksinitrite dönüşümüne bağlı da olabilir.

Pregabalin uygulandıktan sonra iskemi uygulanan grupta NO düzeyleri iskemi ve iskemi+reperfüzyon grubundakinden anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Bu pregabalinin NO aracılı iskemik hasar gelişimini azaltabileceğini gösterir bir bulgudur. Pregabalin uygulanmış grupta iskemi+reperfüzyon sonrası NO düzeylerinde pregabalin+iskemi grubuna göre anlamlı fark saptanmamıştır. Bu reperfüzyon hasarından kaynaklanmış olabilir.

Glutasyon; hücreyi süperoksit ve hidroksil radikallerinden koruyan önemli bir antioksidan enzimdir. Karotisin bilateral 30 dakika oklüzyonunu takiben 24 saat reperfüzyon döneminde GSH-Px düzeyinde azalma gösterilmiştir (94). Çalışmamız sonucu, GSH-Px seviyesi her iki hasar oluşturulan grupta da, enzimin kullanıma bağlı anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). GSH-Px enzimi oksidatif hasar sırasında harcandığı için azalmaktadır. Pregabalin+iskemi grubunun GSH-Px seviyesi, iskemi grubuna göre belli bir artış göstermiştir fakat anlamlı değildir. Bu bulgu pregabalinin iskemik hasarlanma sırasındaki antioksidan GSH-Px enziminin kullanımının azaldığını göstermektedir. Enzim kullanımının bir miktar azalması pregabalinin oksidatif stresi azalttığını düşündürmektedir. Pregabalin + iskemi + reperfüzyonlu grupta ise sadece iskemi + reperfüzyonlu gruba göre GSH-Px değerleri de anlamlı

olarak artmıştır ($p<0.01$). Bu bulgu pregabalinin iskemi reperfüzyon dönemindeki oksidatif hasarlanmayı sadece iskemi dönemindeki hasarlanmaya göre daha belirgin olarak azalttığını düşündürebilir.

Antioksidan bir enzim olan superoksit dismutaz (SOD), O_2^- radikalini detoksifiye eder ve H_2O_2 oluşturur (95). Çalışmamızda SOD enzim seviyelerinde sadece iskemi uygulanan grupta anlamlı bir azalma saptanmıştır. İskemi+reperfüzyon grubunun SOD seviyelerinde, kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlene de anlamlı değildir. Bu bulgu oksidatif hasar nedeniyle enzimin harcanması desteklemektedir. İskemi reperfüzyon sırasındaki enzim düzeyindeki azalmanın anlamlı olmaması uygulanan perfüzyon süresinin kısa olmasından kaynaklanabilir.

Ratlarda yapılan transient MCA oklüzyonu sonrasında uygulanan 24 saatlik iskemi ve reperfüzyon sonucu katalaz enziminde anlamlı düşüş olduğu gösterilmiştir. (96). Çalışmamızda da KAT enzimi seviyesinde sadece iskemi uygulanan grupta anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu bulgu iskemik hasarın göstergesidir. İskemi+reperfüzyon grubunun KAT seviyelerinde, kontrol grubuna göre bir miktar azalma gözlene de anlamlı değildir. Bu durum uygulanan perfüzyonun iskemiyle meydana gelen hasarı azalttığını düşündürür. Pregabalin + iskemi grubunun iskemi grubuna göre ve pregabalin + iskemi + reperfüzyonlu grubun da iskemi + reperfüzyonlu gruba göre KAT seviyelerinde bir artış olmuştur fakat anlamlı değildir. Bu bulgu pregabalinin antioksidan enzimin harcanmasına neden olacak oksidatif stresi bir miktar azalttığını gösterebilir.

SSS' deki NMDA reseptörleri; nöronal plastisite, öğrenme ve hafızada anahtar rol oynar. İskemi ve hipoksi gibi pek çok nörodejeneratif patolojide aktive olduklarında ekzotoksik hücre ölümüne neden olurlar. Aktivasyonu global iskemideki hücre hasarında major basamaktır. NMDA artışı, translasyonu bozar ve NO üretimine neden olur. NO ve NMDA arasında çapraz ilişki olduğu kanıtlanmıştır. Hücre kültürlerinde i NOS tarafından üretilen NO in gliaları hücre ölümüne götürdüğü gösterilmiştir (97). Serebral iskemide nöron ölümünün en önemli sebeplerinden biri aşırı glutamat salınımına bağlı eksitotoksisitedir (1). NMDA reseptörlerinin iskemide rolü olduğu çalışmada gösterilmiştir (75). Çalışmamız kapsamında yapılan biyokimyasal analizler sonucunda beyin dokusunda NMDA reseptörlerinden NR2A'da, gruplar arası anlamlı bir değişiklik yoktur. İskemi grubundaki NR2B reseptörleri miktarı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha

yüksek bulunmuştur. Bu bulgu NMDA reseptörlerinin iskemik kaskaddaki rolünü desteklemektedir. Çalışmamızda iskemi + reperfüzyon grubunda NR2B reseptör düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu da iskemi reperfüzyon hasarında NMDA reseptör artışı ve eksitotoksisitenin rolünü kanıtlamaktadır. Pregabalin + iskemi grubunda NR2B reseptör düzeyleri, iskemi grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunda, iskemi + reperfüzyon grubuna göre NR2B reseptör düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulgular pregabalinin NMDA reseptör miktarını azaltarak iskemi ve iskemi-reperfüzyon dönemlerinde eksitotoksisiteye bağlı hasarlanmayı azaltabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; beyin dokusunda, iskemik beyin hasarı sonrası reperfüzyona bağlı oksidatif hasar meydana gelmektedir. Pregabalin ise bu hasarı antioksidan özelliği ile önlemektedir. Antioksidan özelliği NO miktarını, NMDA reseptörleri NR 2B subünitini azaltarak ya da nöroprotektif etkisiyle antioksidan enzim kullanım ihtiyacını azaltarak yapıyor olabilir. Bu sonuçlar ileride yapılacak klinik çalışmalara ışık tutabilir. Bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Akut iskemik inmede, beyin dokusu geri dönüşsüz olarak zedelenir. İskemik alanın reperfüzyonu ile meydana gelen serbest radikal oluşumu, dokuda hasarlanmayla sonuçlanabilir. Serbest radikaller SOD, GSH-Px ve KAT gibi antioksidan enzimler ile yok edilir. Serbest radikal üretimi, endojen hücrel antioksidan mekanizmaları aştığında, oksidatif stres gelişir.

Pregabalin, GABA'nın yapısal bir analogu olup ratlarda lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve antiinflamatuvar etkisi ile nöroproteksiyon yaptığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir.

Bu çalışmada Wistar cinsi toplam 36 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Ratlar kontrol, pregabalin, iskemi, pregabalin+iskemi, iskemi+reperfüzyon, pregabalin+iskemi+reperfüzyon ve olmak üzere 6 gruba ayrılmıştır. Pregabalin 50mg/kg/gün dozunda 2 gün süresince oral gavaj ile uygulanmıştır. Sağ internal karotis arter bulldog klemp ile oklude edilerek 30 dakika boyunca iskemi ve sonrasında 20 dakika boyunca reperfüzyon uygulanmıştır. Deney sonunda beyin dokusunda TBARS, NO, SOD, GSH-Px, KAT gibi parametrelerin düzeyleri ile NR2A ve NR2B gibi NMDA reseptör tiplerinin konsantrasyonları değerlendirilmiştir.

Beyin dokusunda oksidatif hasar göstergesi olan TBARS ve NO seviyelerinde iskemi ve iskemi + reperfüzyon uygulanan rat grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu hasarlanmanın sonucudur. Pregabalin + iskemi + reperfüzyon grubunun sadece iskemi + reperfüzyon grubuna göre TBARS ve NO düzeylerinde anlamlı olarak azalma gözlenmiştir. İskemi + pregabalin grubunda iskemi grubundakine göre NO düzeyinde anlamlı olarak azalma gözlenmiştir. Antioksidan enzim olan GSH-Px seviyesi her iki hasar oluşturulan grupta da, enzimin kullanıma bağlı anlamlı olarak azalmıştır. Pregabalin + iskemi + reperfüzyonlu grupta ise iskemi + reperfüzyonlu gruba göre GSH-Px değerleri anlamlı olarak artmıştır. Pregabalin, iskemi ve iskemi+ reperfüzyon gruplarında NMDA 2B reseptörler düzeylerinde azalmaya sebep olmuştur. Bu bulgular pregabalinin iskemi reperfüzyon hasarında nöroproteksiyon ile birlikte oksidatif stresin azaltılmasında anlamlı rolü olduğunu ve pregabalinin akut iskemik hasarda

oksidatif stresi azaltmak ve aynı zamanda nöroproteksiyon sağlamak için kullanılabileceğini destekler.

SUMMARY

In acute ischemic stroke, brain tissue is damaged irreversibly. Free radical production by the reperfusion of ischemic area may result in tissue damage. Free radicals are destroyed by antioxidative enzymes like SOD, GSH-Px ve CAT. When free radical production is over the endogenic antiokxidative mechanisms, oxidative stress occurs.

Pregabalin, a structural GABA analog, has been shown to exhibit neuroprotection with its lipid peroxidation and antiinflammatory effect in rats in some studies.

In this study, 36 Wistar Albino type male rats was used. Rats were divided into six groups which were control, pregabalin, ischemia, pregabalin+ ischemia ischemia+ reperfusion and pregabalin+ ischemia + reperfusion. Pregabalin was applied with oral gavage through two days in 50 mg/kg/day dose. Ischemia was performed by occluding the right internal carotid artery with bulldog clamp for 30 minutes, then reperfusion was performed through 20 minutes. In the end of the experiment, parameters like TBARS, NO, SOD, GSH-Px, CAT levels and concentrations of NMDA receptor types like NR2A ve NR2B was evaluated.

As an indicator of oxidative damage in brain tissue, TBARS and NO levels in ischemia and ischemia+ reperfusion groups were significantly more increased than was in control group. This yields damage. TBARS and NO levels of pregabalin+ischemia+ reperfusion were significantly more decreased than that of ischemia+ reperfusion group. In ischemia + pregabalin group, NO level was significantly more decreased than was in ischemia group. GSH-Px level, which is an antioxidative enzyme, was decreased in both damage group dependent on the usage of enzyme. GSH-Px levels in pregabalin+ ischemia+ reperfusion group were significantly more increased than in comparison to ischemia+ reperfusion group. Pregabalin led to decreased NMDA NR2B reseptors levels in ischemia and ischemia+ reperfusion rat groups. This findings supports a significant role of pregabalin in the reduction of oxidative stres along with neuroprotection in ischemia and reperfusion damage and suggests that pregabalin may be used in acute

ischemic brain injury for both to decrease the oxidative stress and also to provide neuroprotection.

KAYNAKLAR

- 1- Demirci İ, Delibaşı T, Kayahan İK, Demirci EBS. Akut iskemik serebrovasküler olayda reperfüzyon hasarı engellenebilir mi? Moleküler mekanizmalara yönelik yeni gelişmeler. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. 2004; 2(3): 53–56.
- 2- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009; 111(6): 483–495.
- 3- Kavaklı A, Cet A, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna E. Ratlarda beyin iskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan morfolojik değişikliklere melatonin ve pinealektominin etkisi. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg*. 2007; 21(2): 63-66
- 4- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17(1): 24-38
- 5- Costa C, Martella G, Picconi B, Prosperetti C, Pisani A, Di Filippo M, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke*. 2006; 37(5): 1319–1326.
- 6- Ha KY, Kim YH, Rhyu KW, Kwon SE. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur Spine J*. 2008; 17(6): 864–872.
- 7- Ceyhan M, Tan E, A new anticonvulsant pregabalin. Preclinical Data. *TJN*. 2008; 14(3):161 – 171
- 8- Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, Walker LC. Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res*. 2006; 1075(1): 68–80.
- 9- Kavoussi R. Pregabalin: From molecule to medicine. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006; 16: 128–133.
- 10- Belliotti TR, Capiris T, Ekhatov IV, Kinsora JJ, Field MJ, Heffner TG, Meltzer LT, Schwarz JB, Taylor CP, Thorpe AJ, Vartanian MG, Wise LD, Zhi-Su T, Weber ML, Wustrow DJ. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the alpha(2)-delta protein. *J Med Chem*. 2005; 48(7): 2294–2307.
- 11- Kumar A, Goyal R. Possible involvement of GABAergic modulation in the protective effect of gabapentin against immobilization stress-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21(6): 575–581.
- 12- Balkan S. Serebrovasküler Hastalıklar. 2. Baskı. 2005
- 13- Kumral E. Serebrovasküler Hastalıkların Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*. 2004; 2(1):15–21
- 14- Köseođlu A, Köseođlu Z, Satar D. Serebral iskemi. *Arşiv* 2006; 15–61
- 15- Murat Sumer M, Erturk O. Ischemic stroke subtypes: risk factors, functional outcome and recurrence. *Neurol Sci*. 2002; 22(6): 449–454.

- 16- Meschia JF. Subtyping in ischemic stroke genetic research. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2002; 11(5): 208– 219.
- 17- Utku U. İnme Tanımı, Etiyolojisi, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2007; 53 Özel Sayı 1; 1–3
- 18- Bıçakçı Ş, Özeren A, Bıçakçı K, Peköz MT, Karayalçın C. İntraserebral Kanamalarda Risk Faktörleri Profili Ve MR-Anjiyografi Bulguları. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi* 2007; 13(3): 87–90
- 19- Onat S, Erkin G. Risk factors of stroke. *FTR Bil Der J PMR Sci* 2008;1: 30–37
- 20- Yıldız N, Şanal E, Sarsan A, Topuz OI, Ardiç F. İnmeli hastaların özellikleri ve fonksiyonel sonuçlarını etkileyen faktörler. *FTR Bil Der - J PMR Sci* 2009;12: 59–66
- 21- Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, Baybaş S. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam.* 2005, 18(3):129–135
- 22- Kıyan S, Öz Saraç M, Ersel M, Aksay E, Yürüktümen A, Musalar E, Çevrim Ö. Acil servise başvuran akut iskemik inmeli 124 hastanın geriye yönelik bir yıllık incelenmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi.* 2009; 8(3): 15-20
- 23- Sanossian N, Ovbiagele B. Prevention and management of stroke in very elderly patients. *Lancet Neurol.* 2009; 8(11): 1031–1041.
- 24- Kagan A, Popper J, Reed DM, MacLean CJ, Grove JS. Trends in stroke incidence and mortality in Hawaiian Japanese men. *Stroke.* 1994; 25(6): 1170–1175.
- 25- UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UKPDS 38. *BMJ.* 1998; 317: 703–713.
- 26- Telman G, Sprecher E, Namestnikov O, Kouperberg E. Comparison of risk factors and work-up in young and middle-aged patients with TIA and ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 2010; 17(4): 567–571.
- 27- Özdemir Ö. Patent Foramen Ovale ve İskemik Strok: PFO - İskemik Strok İlişkisi, Klinik Ve Laboratuvar Tanı. *Türk Serebrovasküler Hastalıklar Dergisi.* 2008; 14(1): 9–13
- 28- Amarenco P, Labreuche J. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5): 453–463.
- 29- U-King-Im JM, Young V, Gillard JH. Carotid-artery imaging in the diagnosis and management of patients at risk of stroke. *Lancet Neurol.* 2009; 8(6): 569–580.
- 30- Demirci S, Yalçın BZ, Bakaç G, Dayan C, Aysal F. İnmelerde Tekrarlayıcılığı Etkileyen Risk Faktörleri. *Düşünen Adam Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi* 2010; 23: 38-43
- 31- Nolte CH, Jungehulsing GJ, Rossnagel K, Roll S, Haeusler KG, Reich A, Willich SN, Villringer A, Müller-Nordhorn J. Vascular risk factor awareness before and pharmacological treatment before and after stroke and TIA. *Eur J Neurol.* 2009 Jun;16(6):678–683.
- 32- Grau AJ, Boddy AW, Dukovic DA, Buggle F, Lichy C, Brandt T, Hacke W; CAPRIE Investigators. Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. *Stroke.* 2004; 35(5): 1147–1152.

- 33- Yemişçi M, Gürer G, Dalkara T. İskemik inmede gelişen Fizyopatolojik olaylar. *Türkiye Klinikleri Nöroloji*. 2004; 2(1): 22–28
- 34- Gorgulu A, Kırış T. Eksitator aminoasidler ve eksitotoksisite. *Türk Nöroşirürji Dergisi*. 2005; 15(1): 33–38
- 35- Yanık B, Görülü A, Kırış T, Çobanoğlu S. Fokal serebral iskemi-reperfüzyon modelinde Nimodipin ve Memantin'in etkileri. *Türk Nöroşirürji Dergisi*. 2002; 32: 216- 221
- 36- Memişoğulları R. Diyabette serbest radikaller ve antioksidanlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3: 30–39
- 37- Rahman A, Üstünda B, Özercan İH, Burma O, Çekirdekçi A, Özveren MF, Uyar İS, Global serebral iskemi sonrası reperfüzyon hasarını azaltmada flavinoidlerin rolü. *TGKDÇD* 1999; 7: 6, 430–434
- 38- Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik gelişim*. 2008: 5–13
- 39- Rodríguez-Yañez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol*. 2008; 21(3): 353–357
- 40- Liebeskind DS. Reperfusion for acute ischemic stroke: arterial revascularization and collateral therapeutics. *Curr Opin Neurol*. 2010; 23(1): 36–45.
- 41- Del Zoppo GJ. Plasminogen activators in ischemic stroke: introduction. *Stroke*. 2010; 41: 39–41.
- 42- Donnan GA, Baron JC, Ma H, Davis SM. Penumbra selection of patients for trials of acute stroke therapy. *Lancet Neurol*. 2009; 8(3): 261–269.
- 43- Sharma SR, Sharma N. Hyperacute thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator of acute ischemic stroke: feasibility and effectivity from an Indian perspective. *Ann Indian Acad Neurol*. 2008; 11(4): 221–224.
- 44- Dorado L, Millán M, de la Ossa NP, Guerrero C, Gomis M, López-Cancio E, Ricciardi AC, Dávalos A Influence of antiplatelet pre-treatment on the risk of intracranial haemorrhage in acute ischaemic stroke after intravenous thrombolysis. *Eur J Neurol*. 2010; 17(2): 301–306.
- 45- Kıyan S, Öz Saraç M, Ersel M, Aksay E, Yürüktümen A, Musalar E, Çevrim Ö. Acil Servise Başvuran Akut İskemik İnme 124 Hastanın Geriye Yönelik Bir Yıllık İncelenmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi*. 2009; 8(3): 15-20
- 46- Marder VJ, Jahan R, Gruber T, Goyal A, Arora V. Thrombolysis with plasmin: implications for stroke treatment. *Stroke*. 2010; 41: 45–49.
- 47- Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol*. 2008; 153: 325–338.
- 48- Traystman RJ. Neuroprotection: introduction. *Stroke*. 2010; 41: 63.
- 49- Yang Y, Li Q, Yang T, Hussain M, Shuaib A. Reduced brain infarct volume and improved neurological outcome by inhibition of the NR2B subunit of NMDA receptors by using CP101, 606–27 alone and in combination with rt-PA in a thromboembolic stroke model in rats. *J Neurosurg*. 2003; 98(2): 397–403.
- 50- Marinov MB, Harbaugh KS, Hoopes PJ, Pikus HJ, Harbaugh RE. Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. *J Neurosurg*. 1996; 85(1): 117–124.

- 51- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. Neuroprotective effects of combination therapy with tirilazad and magnesium in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1999; 44(1): 163–71; discussion 171–172.
- 52- Izumi Y, Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991; 11(6): 1025–1030.
- 53- Yang Y, Li Q, Ahmad F, Shuaib A. Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat. *Neurosci Lett*. 2000; 12;285(2): 119–122.
- 54- Adibhatla RM, Hatcher JF. *Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia*. *J Neurosci Res*. 2002; 70(2): 133–139.
- 55- Kakihana M, Fukuda N, Suno M, Nagaoka A. Effects of CDP-choline on neurologic deficits and cerebral glucose metabolism in a rat model of cerebral ischemia. *Stroke*. 1988; 19(2): 217–222.
- 56- Sobrado M, López MG, Carceller F, García AG, Roda JM. Combined nimodipine and citicoline reduce size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2003; 118(1): 107–113.
- 57- Lee JY, Friedman JE, Angel I, Kozak A, Koh JY. The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2004; 25(10): 1315–1321.
- 58- Huh PW, Belayev L, Zhao W, Busto R, Saul I, Ginsberg MD. The effect of high-dose albumin therapy on local cerebral perfusion after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 1998; 804(1): 105–113.
- 59- Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Belayev A, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol*. 2001; 428(2): 193–201.
- 60- Koch S, Concha M, Wazzan T, Romano JG, Forteza A. High dose human serum albumin for the treatment of acute ischemic stroke: a safety study. *Neurocrit Care*. 2004; 1(3): 33
- 61- Belayev L, Marcheselli VL, Khoutorova L, Rodriguez de Turco EB, Busto R, Ginsberg MD, Bazan NG. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke*. 2005; 36(1): 118–123.
- 62- Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*. 1992; 29(2): 243–246.
- 63- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ; Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76(10): 1366–1372.
- 64- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütger E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002; 8(8): 495–505.
- 65- Salom JB, Pérez-Asensio FJ, Burguete MC, Marín N, Pitarch C, Torregrosa G, Romero FJ, Alborch E. Single-dose ebselen does not afford sustained neuroprotection to rats subjected to severe focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2004; 495(1): 55–62.

- 66- Green AR, Ashwood T. Free radical trapping as a therapeutic approach to neuroprotection in stroke: experimental and clinical studies with NXY-059 and free radical scavengers. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4(2): 109–118.
- 67- Sydeserff SG, Borelli AR, Green AR, Cross AJ. Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(1): 103–12.
- 68- Wang CX, Shuaib A. NXY-059: a neuroprotective agent in acute stroke. *Int J Clin Pract.* 2004; 58(10): 964–969.
- 69- Lapchak PA, Araujo DM, Song D, Wei J, Zivin JA. Neuroprotective effects of the spin trap agent disodium-[(tert-butylimino)methyl]benzene-1,3-disulfonate N-oxide (generic NXY-059) in a rabbit small clot embolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2002; 33(5): 1411–1415.
- 70- Kuroda S, Tsuchidate R, Smith ML, Maples KR, Siesjö BK. Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(7): 778–787
- 71- Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, Hattori K, Shimazu T, Yamazato M, Nagoya H, Kato Y, Araki N. Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and nNOS-knockout mice. *Curr Neurovasc Res.* 2010; 7(1): 23–31
- 72- Erdiñç L, Erdiñç M, Deniz M. Effect of 7-Nitroindazole on lipid peroxidation induced by cerebral ischemia and reperfusion injury in rats. *Dicle Tip Dergisi (Journal of medical school)* 2000; 27: 1
- 73- Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, Yoshida T, Irikura K, Dalkara T. L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke.* 1994; 25(2): 429–435.
- 74- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(15): 8880–8885.
- 75- Murphy TH, Li P, Betts K, Liu R. Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *J Neurosci.* 2008; 28(7): 1756–1772.
- 76- Guard DB, Swartz TD, Ritter RC, Burns GA, Covasa M. Blockade of hindbrain NMDA receptors containing NR2 subunits increases sucrose intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(4): 921–928.
- 77- Luszczyk JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep.* 2009; 61(2): 197–216.

- 78- Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, Göthert M. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology*. 2002; 42(2): 229–236.
- 79- Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 2004;45 (Suppl 6): 13–18.
- 80- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-275
- 81- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-689
- 82- Delibas N, Doguc DK, Sutcu R, Eroglu E, Gökalp O. Effect of Nicotine on hippocampal nicotinic acetyl choline alfa7 receptor and NMDA receptor subunits 2A and 2B expression in young and old rats. *Int J Neurosci* 2005; 115(8): 1151-1163
- 83- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121–26.
- 84- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke:therapeutic Approaches.*Journal of Translational Medicine*. 2009; 7(97): 1-11
- 85- Nakamura T, Tanaka S, Hirooka K, Toyoshima T, Kawai N, Tamiya T, Shiraga F, Tokuda M, Keep R. F, Itano T, Miyamoto O, Anti-oxidative effects of d-allose, a rare sugar, on ischemia-reperfusion damage following focal cerebral ischemia in raT. *Neurosci Lett* 2010; 1-4
- 86- Jung J E, Kim GS, Chen H, et al.. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke:from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2010; 41:172–9
- 87- Kıyıcı A, Yücel D, Antiepileptik ilaç kullanımı ve oksidatif stres. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007; 5(2):57-62
- 88- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008; 55: 310-318
- 89- Green AR, Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly, *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: 325–338
- 90- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye Q. N, Hensley K. Antioxidants in Central Nervous System Diseases: Preclinical Promise and Translational Challenges. *J Alzheimers Dis*. 2008 ; 15(3): 473–493.
- 91- Sean I. Savitz, MD, and Marc Fisher, MD, Future of Neuroprotection for Acute Stroke:In the Aftermath of the SAINT Trials. *Ann Neurol* 2007; 61: 396–402
- 92- Ma H; Zavala JA, Teoh H, Churilov L, Gunawan M, Ly J, Wright P, Phan T, Arakawa S, Davis S M, Donnan GA. Fragmentation of the Classical Magnetic Resonance Mismatch “Penumbral” Pattern With Time, *Stroke*. 2009;40:3752-3757.
- 93- Domínguez C, Delgado P, Vilches A, Martín-Galla P,Ribo’ M, Santamarina E Molina C, Corbeto N, Rodríguez-Sureda V, Rosell A, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke, *Stroke*. 2010; 41: 653-660.
- 94- Gaur V, Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacological reports*. 2010; 62: 635-648

- 95- Jung JE, Kim GS, Chen H, CM, Narasimhan P, Song YS, Niizuma K, Katsu M, Okami N, Yoshioka H, Sakata H, Sakata H, Goeders CE, Chan PH. Reperfusion and Neurovascular Dysfunction in Stroke: from Basic Mechanisms to Potential Strategies for Neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2010; 41: 172–179
- 96- Maheshwari A, Badgujar L, Phukan B, Bodhankar SL, Thakurdesai P. Protective effect of Etoricoxib against middle cerebral artery occlusion induced transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 667: 230-237
- 97- Petegnief V, Font-Nieves M, Mart'In ME, Salinas M, Planas AM. Nitric oxide mediates NMDA-induced persistent inhibition of protein synthesis through dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and eukaryotic initiation factor 4G proteolysis. *Biochem. J.* 2008; 411: 667–677.