

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Nöroloji Anabilim Dalı

141696

# DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİDE ERİTROPOİETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİ

( UZMANLIK TEZİ )

141696

TEZ YÖNETİCİSİ  
Yrd. Doç. Dr. M. Ufuk ALUÇLU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DİJİTALİZASYON MERKEZİ

Dr. Abdullah ACAR

DİYARBAKIR-2004

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I.TEŞEKKÜR	II
II.KISALTMALAR	III
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serebrovasküler Hastalıkların Tanımı ve Sınıflaması	3
2.2. Serebrovasküler Hastalıkların Epidemiyolojisi	5
2.3. Serebrovasküler Hastalıkların Vasküler Anatomisi	5
2.4. Serebrovasküler Hastalıkların Fizyolojisi	7
2.5. İskemik Penumbra ve Terapotik Zaman Aralığını Etkileyen Faktörler	14
2.6. Bölgesel Serebral İskeminin Fizyopatolojisi	19
2.7. Deneysel Serebral İskemi Modelleri	33
2.8. İskemik İnmede Nöroprotektif Tedavi	37
2.9. Eritropoietin	38
3. MATERYAL VE METOD	40
3.1. Deney Sıçanlarının Hazırlanması	40
3.2. Klinik Takip	44
3.3. Deneysel Gruplar	45
3.4. İnfarktın Değerlendirilmesi	45
3.5. İstatistiksel Analiz	46
4. SONUÇLAR	47
5. TARTIŞMA	58
6. ÖZET	62
7. SUMMARY	63
8. KAYNAKLAR	64

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım, bölüm başkanımız Doç. Dr. Nebahat Taşdemir'e , Yrd. Doç. Dr. İsmail Apak'a, tezimi hazırlamamda değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. M. Ufuk Aluçlu'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimi hazırlamamda katkıda bulunan arkadaşım Dr Hüseyin Karasu'ya, Yrd. Doç. Dr.Arslan Güzel'e, Doç. Dr. Mehmet Yıldız'a, Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin Bulut'a, Yrd. Doç. Dr. Cengiz Turgut'a , Dr. Ebru Kale'ye, Dr Seyfi Arslan'a, Dr Enver Aydın'a, DÜSAM personeline ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık eğitimime katkısını hiçbir zaman unutamayacağım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Yılmaz Ütkür'ü rahmetle ve saygıyla anıyorum.

Dr. Abdullah ACAR

## II.KISALTMALAR

<b>ACA</b>	: Anterior Communis Arter
<b>ATP</b>	: Adenozin Tri Fosfat
<b>CCA</b>	: Kommon Karotid Arter
<b>CGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>CGRP</b>	: Kalsitonin Gen Related Peptid
<b>DAG's</b>	: Diaçilgliserid
<b>Dm</b>	: Digastrik Kas
<b>DWI</b>	: Diffüzyon MR
<b>EAA</b>	: Eksitatör Amino Asit
<b>ECA</b>	: Eksternal Karotid Arter
<b>EDRF</b>	: Endotelyum Deriveli Serbestleştirici Faktör
<b>ELAM-1</b>	: Endotel Lökosit Adezyon Molekülü-1
<b>Epo</b>	: Eritropoietin
<b>Epo-R</b>	: Epo Reseptörü
<b>FFA</b>	: Serbest Yağ Asitleri
<b>GFAP</b>	: Glial Fibriler Asidik Protein
<b>Hn</b>	: Hipoglossal Sinir
<b>ICA</b>	: İnternal Karotid Arter
<b>İL-6</b>	: İnterlökin 6
<b>İSK</b>	: İntraserebral Kanama
<b>La</b>	: Lingual Arter
<b>L-NMMA</b>	: N- Monometil-L-Arjinin
<b>Ma</b>	: Maksiller Arter
<b>MCAO</b>	: Middle Cerebral Arteriyel Occlusion (Orta Serebral Arter Oklüzyonu)
<b>NINDS</b>	: Amerikan Nörolojik Bozukluklar ve İnme Ulusal Enstitüsü (National İnstitute of Neurological Disorders and Stroke)
<b>NMDA</b>	: N-Metil-D Aspartat
<b>NO</b>	: Nitrik Oksid
<b>Oa</b>	: Oksipital Arter

<b>Om</b>	: Omohyoid Kas
<b>OAKB</b>	: Ortalama Arteriyel Kan Basıncı
<b>Pa</b>	: Pterigopalatin Arter
<b>PCA</b>	: Posterior Kommunis Arter
<b>pCO<sub>2</sub></b>	: Parsiyel Karbondioksit Basıncı
<b>PET</b>	: Pozitron Emisyon Tomografi
<b>PMNL</b>	: Polimorf Nüveli Lökosit
<b>PPA</b>	: Pterigopalatin arter
<b>PUFA</b>	: Poliansatüre Yağ Asidleri
<b>PWI</b>	: Perfüzyon MR
<b>SAK</b>	: Subaraknoid Kanama
<b>SKA</b>	: Serebral Kan Akımı
<b>Sm</b>	: Sternomastoid Kas
<b>SP</b>	: Substans P
<b>SPB</b>	: Serebral Perfüzyon Basıncı
<b>STA</b>	: Superior Tiroid Arter
<b>SVR</b>	: Serebrovasküler Rezistans
<b>TNF-a</b>	: Tümör Nekrozis Faktör a
<b>TMT</b>	: Trimetiltin
<b>TTC</b>	: Triphenyl Tetrazolium Chlorid
<b>UY</b>	: Uyarılmış Yanıt
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
<b>VİP</b>	: Vazoaktif İntestinal Peptid
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnme bir beyin bölgesinin, iskemi veya kanama sonucu kalıcı veya geçici olarak etkilenmesi ve/veya beyni ilgilendiren bir ya da daha fazla kan damarının primer patolojisi olarak tanımlanır (1).

Arterin yeterli kanı iletememesiyle, ilişkili beyin bölgesinin nekroze olmasına serebral infarkt denir. İnfarktüsün oluşup oluşmayacağı, büyüklüğü ve şekli tıkanan damara, hemodinamik değişikliklere, beyin arterleri arasındaki anastomozların varlığına ve bunların derecelerine bağlıdır.

Serebral inme konusu araştırılırken beyinde iskemi sonucu oluşan nöronal hasar önlenemez kesin bir sonuç olarak görüldüğü için tedaviye yönelik çalışmalar, bozulmuş kan akımının düzeltilmesiyle sınırlı kalmaktaydı. İskemik nöronal hasarın hücrel özelliklerini anlamaya yönelik son yıllarda yapılan araştırmalar inme üzerine yapılan araştırmaların dar sınırlarını zorlamaktadır (3).

Serebral iskeminin klinik pratikteki önemi, değişik biçimlerdeki deneysel iskemi modellerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Deneysel serebral iskemi çalışmalarında insan iskemik inme sendromuna oldukça yakın bir modelin oluşturulmasında sıçanların kullanımı birçok yönden avantajlar getirmektedir. Sıçan beyninden elde edilmiş olan çok sayıda nörokimyasal verilere ek olarak, insan intrakranial dolaşımına olan benzerliği ve düşük maliyeti nedeniyle oldukça fazla denek sayısı gerektiren istatistiksel analiz amaçlı çalışmalara uygunluğundan dolayı deneysel serebral iskemi modelinde sıçanlar geniş kullanım alanı bulmuşlardır.

Sıçanlarda Orta Serebral Arter Oklüzyonu (MCAO), diğer serebral iskemi modellerine göre çeşitli üstünlüklere sahiptir. Öncelikle global iskemi modellerinin aksine, bir serebral arterin oklüzyonu bölgesel bir serebral kan akımı (SKA) değişikliği yaratmakta ve iskemik bölgelerin perfüze edilen dokularla karşılaştırılması aynı beyinde mümkün olabilmektedir. MCAO'a bağlı iskemi, genel olarak iskemik odakta yoğunlaşırken daha az olarak iskemik penumbra alanı da etkilemektedir. Odaktaki hücreler, genellikle hızla reperfüzyon sağlanmazsa aynı şekilde kalırlar. Penumbra alanı içerdiği hücreler ise risk altında oldukları halde en az 4-8 saat yaşayabilir durumda

kalabilmektedir. Penumbradaki hücreler, reperfüzyon veya ilaçlarla kurtarılabilir ve penumbral alana doğru infarktın genişlemesi engellenebilir (4).

Eritropoietin (Epo) sinir sisteminde varlığı ve nöroprotektif etkisi son yıllarda gösterilmiş olan hematopoetik bir sitokin hormondur. Hücre canlılığını arttırıcı sinyalleri modüle edici, anti-apoptotik, anti-oksidan, anti-inflamatuar, kalsiyum ve glutamat metabolizmaları üzerine modüle edici etkileri nöroprotektif etkisine aracılık ettiği düşünülen Epo'ın in vivo inme, nöroinflamasyon, beyin travması, subaraknoid kanama, deneysel epilepsi ve parkinsonizm gibi deneysel modellerde de nöronları koruyucu etkisi belirlenmiştir.

Bu çalışmada amaç, sıçanlarda geçici, 2 saatlik MCAO oluşturmak, sonra reperfüzyon sağlandıktan sonra nöroprotektif etkisi son yıllarda kanıtlanmış olan Epo verilerek, izotonik verilen kontrol grubuyla karşılaştırılarak Epo'ın nöroprotektif etkisini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serebrovasküler Hastalıkların Tanımı ve Sınıflaması

Amerikan Nörolojik Bozukluklar ve İnme Ulusal Enstitüsü (National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) ) serebrovasküler hastalığı “bir beyin bölgesinin, iskemi veya kanama sonucu kalıcı veya geçici olarak etkilenmesi ve/veya beyni ilgilendiren bir ya da daha fazla kan damarının primer patolojisi” tanımlamıştır(1).

Serebrovasküler hastalık genel bir terim olmasına karşın, inme; başlangıcının akut olması nedeni ile sınırlı bir anlam içerir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization (WHO) ) kriterlerine göre inme “ani gelişen, 24 saatten fazla uzun süren ya da bu süre içerisinde ölümlle sonlanan, vasküler nedenden başka bir neden ortaya konulamayan, fokal veya yaygın nörolojik defisit” olarak tanımlanmıştır (5,6).

İskemi; kan akımının hücresel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. Aerobik koşullarda yaşayan biyolojik organizmalar, temel yaşam kaynakları olan oksijen ve metabolik substratlar ortamda bulunmadığı zaman canlılıklarını belirli bir süre devam ettirebilmektedir. Santral sinir sistemi, kısıtlı anaerobik metabolizması ve glikojen depoları nedeniyle iskemiye en duyarlı dokulardan biridir. İskemi sırasında beyinde hücresel enerji depolarının tükenmesi iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zincirini başlatmaktadır. Enerji eksikliği ile devreye giren iskemik olaylar zinciri, bir dizi sekonder olayı başlatırsa da iskeminin gidişini etkileyen pek çok faktör nedeniyle hücre ölümü kaçınılmaz sonuç değildir. İskemi sonucunu belirleyen en önemli iki faktör, iskeminin derinliği ve süresidir.

İskemik infarktlar, vasküler lezyonun lokalizasyonu ve tipi ile iskeminin mekanizmaları temel alınarak farklı subgruplarda sınıflandırılabilir. Nörolojik semptomlar, inme çapı ve lokalizasyonu ile sıklıkla ilgilidir. Klinik semptom ve belirtiler, etkilenmiş anatomik bölge ve vasküler alana göre değişiklikler gösterebilir. Serebrovasküler hastalıkların sınıflandırılmasında bugün için kabul edilen NINDS sınıflandırmasıdır(Tablo-1),(1).



**Tablo 1: Amerikan Nörolojik Bozukluklar ve İnme Ulusal Enstitüsü (NINDS)  
Tarafından Yapılan Serebrovasküler Hastalıkların Sınıflaması (1)**

**A- Asemptomatik**

**B- Fokal beyin disfonksiyonu**

**1- Geçici iskemik atak**

- a. Karotid sistemde
- b. Vertebrobaziller sistemde
- c. Her ikisinde
- d. Lokalize edilemeyen
- e. Olası geçici iskemik atak

**2- İnme**

**a. Geçici profil**

- 1) İlerleyen
- 2) Daha da kötüleşen
- 3) Stabil inme

**b. İnme tipi**

- 1) Beyin hemorajisi
- 2) Subaraknoid hemoraji
- 3) Arterovenöz malformasyona bağlı intrakranial hemoraji
- 4) Beyin infarktı

**a) Mekanizmalar**

- 1) Trombotik
- 2) Embolik
- 3) Hemodinamik

**b) Klinik sınıflama**

- 1) Aterotrombotik
- 2) Kardiyoembolik
- 3) Laküner
- 4) Diğerleri

**c) Semptom ve belirtilen dağılımı**

- 1) İnternal Karotid arter
- 2) Medial serebral arter
- 3) Anterior serebral arter
- 4) Vertebrobaziler Sistem
  - a) Vertebral arter
  - b) Baziler arter
  - c) Posterior serebral arter

**C- Vasküler demans**

**D- Hipertansif ensefalopati**

## **2.2.Serebrovasküler Hastalıkların Epidemiyolojisi**

Tüm inmeler içinde beyin infarktı %80 (%70-85), intraserebral kanama (İSK) %15 (%7-15) ve subaraknoid kanama (SAK) ise %5 (%2-8) oranında görülür. İnme koroner kalp hastalığı ve tüm kanserlerin ardından üçüncü sıklıkta gelen ölüm nedenidir (2).

İnme ile ilgili istatistiksel veriler insidans da dahil olmak üzere coğrafi, ırksal ve etnik farklılıklar göstermektedir. Son iki dekatta yapılmış olan çalışmalarda inme insidansının 1-3/1000 arasında ve prevalansın 6/1000 civarında olduğu söylenebilir (7,8). İnme insidansı yaş ile belirgin derecede artmakta olup 45 yaş altındakilerde yıllık insidans 0.1-0.2/1000 dolayında iken, 85 yaş üzerinde bu oran 20/1000'e kadar çıkmaktadır (9,10).

## **2.3.Serebrovasküler Hastalıkların Vasküler Anatomisi**

Beyin iki serebral hemisferden ve derindeki büyük yapıları (bazal ganglion ve talamusu, kortekse çıkan ve inen beyaz madde yolları ve beyin omurilik sıvısı (BOS) ile dolu ventriküler sistemi ) saran serebral korteksten oluşur. Serebral korteks frontal, paryetal, temporal ve oksipital loplara ayrılır. Serebrumun orta beyin, pons ve medullayı içeren derin yapıları beyin köküne bağlanır.

İnternal karotis arter serebral hemisferlerin kan dolaşımını sağlar. Sağ arteria karotis kommunis brakiosefalik gövdeden, sol arteria karotis kommunis arkus aortadan köken alır. Her iki a.karotis kommunis boyunda mandibula açısının hemen altında ikiye ayrılır ve beyine giden arteria karotis interna ile yüze giden arteria karotis eksternayı oluşturur. İnternal karotis arter petroz kemik ve kavernoöz sinüsü geçerek oftalmik arteri oluşturup dallara ayrılarak göze doğru yol alır. Anterior koroidal arter dalı orta serebral ve anterior serebral arterlere ayrıldığı yerden hemen önce internal karotis arterden köken alır. Anterior veya koroidal arter medial temporal loba kan sağlar. Orta serebral arter frontal, parietal ve temporal loları içeren serebral hemisferlerin lateral yüzeyinin dolaşımını sağlar. Orta serebral arterin horizontal bölümünden gelen küçük dallar -lentikülostriat arterler- bazal ganglionun derindeki yapılarını ve internal kapsülüne kan sağlar; bu yapı

korteks ve alttaki yapılar arasındaki beyaz maddeden oluşan ana bağlantı yoludur. Anterior serebral arter; frontal, paryetal ve temporal lopları içeren serebral hemisferlerin medial yüzeyine kan sağlar.

Beyin sapının kanını iki vertebral arter sağlar; bu arterler her iki tarafta da subklavyan arterlerden köken alır ve birleşerek baziller arteri oluştururlar. Posterior inferior serebellar arter, proksimal intrakranial vertebral arterden köken alarak inferior serebellum ve lateral medullanın kan dolaşımını sağlar. Anterior serebellar arter ve süperior serebellar arter baziller arterden köken alır ve baziller arterden çıkan küçük arterle beyin kökü ve serebellumun geri kalan bölümüne kan sağlar. Baziller arterin uç dalları posterior serebral arterleri oluşturur ve bu arterler talamus ile birlikte parietal ve temporal loplara posterior bölümlerine ve oksipital loba kan sağlar.

Major bir damar tıkanıdığı zaman kollateral anastomozlardan oluşan yoğun bir ağ beynin primer kan desteğinden yoksun alanlarını besler. Ana kollateral kanal beyin tabanındaki Willis halkasından oluşur. İki karotis arter anterior kommunis arterler (ACA) boyunca birbirleri ile bağlantılar oluşturur. Posterior serebral arterle birlikte iki karotis arter posterior kommunis arterin (PCA)'de katılımıyla serebral ve vertebrobasiller dolaşım arasında kollateral bir yol oluşturur. İnternal karotis arter tıkanıdığı zaman eksternal karotis arter ve internal karotis arter arasında kollateral kanallar da oluşabilir. Eksternal karotis arterin supraorbital dalından gelen kan internal karotis arteri doldurmak için oftalmik arter boyunca geriye doğru akabilir ve eksternal karotis arterin meningeal dalları serebral arterlerin distal dalları ile anastomoz yapabilir. Beyin dolaşımında hemisferlerin orta bölümündeki orta ve anterior serebral arter alanlarının birleşim yerinde serebral arterlerin distal dallarının ortak akım alanlarında ve posterior parietal lobta orta ve posterior serebral arterlerin birleşim alanında boşalma havzaları oluşur. Perfüzyon basamağındaki ani düşüşlerde bu alanlar iskemiye daha açık alanlardır (11).

## **2.4. Serebrovasküler Hastalıkların Fizyolojisi**

### **2.4.1. Normal Serebral Kan Akımı (SKA)**

Erişkin beyni, 1300-1400 gram ağırlığındadır ve beynin temel elemanları olan nöronlar ve glialar metabolizmalarının normal işlevlerini sürdürebilmeleri için her dakikada 500-600 ml oksijen ve 75-100 mg glukoza gereksinim duyarlar. Bunlar kan dolaşımının devamlılığı ile sağlanır. Dinlenme halinde, her bir kardiyak kontraksiyonla yaklaşık 70 ml kan assendan aortaya yollanmaktadır. 10-15 ml ise beyin için ayrılmaktadır. Her iki karotis arter dakikada 350 ml, vertebrobasiller sistem ise 150-200 ml kanı beyine taşır. Birkaç dakikalık işlev bozukluğu sonucunda bile oksijen ve glukoz azalıp kritik seviyelere inebilir. Beyin dokusu bu maddeleri depolayamadığından ve metabolizması çok yüksek olduğundan serebral dolaşımda 6-10 saniyelik kritik düzeyde bir duraklama geriye dönüşümlü nöronal metabolik bozukluğuna ve bilinç yitimine neden olur. Serebral dolaşımda 30 saniyelik bir kesilme beyin metabolizmasında değişikliğe yol açarken, 5 dakika sonra irreversibl beyin dokusu yıkımı ve serebral enfarkla sonlanabilecek anoksi başlar (12-16).

Serebral kan akımı kontrolünde birbirine bağlı dört mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar:

- 1-Metabolik kontrol
- 2-Nöral kontrol
- 3-Karbondioksit
- 4-Otoregülasyon'dur.

#### **2.4.1.1.-Metabolik Kontrol**

Lokal serebral kan akımı bölgesel olarak heterojendir. Nöronal aktivite beyinde en fazla enerji harcayan yapıdır. Lokal serebral kan akımı, enerji üretim düzeyini ayarlar. Böylelikle nöronal döngüdeki aktivite, varyasyonların major belirleyeni ve SKA'nın bölgesel paternidir (17).

Normalde bölgesel nöronal aktiviteye gerekli oksijen ve glukozu karşılamak için mükemmel bir kan akımı ayarlaması vardır (18,19). Bu ayarlama, metabolik regülasyon olarak adlandırılmaktadır. Lokal

metabolitlerdeki konsantrasyon değişiklikleri bölgesel SKA değişikliklerine yol açar. Birkaç kimyasal yapı, nöronal veya glial aktivitesinin artması durumunda lokal vasküler tonusu değiştirebilmekte, bunlar akım ve metabolizma arasındaki medyatörler olarak değerlendirilmektedir (17). Bu mediatörler, ekstrasellüler pH, pCO<sub>2</sub>, adenozin, glikolitik intermediatörler, ekstrasellüler potasyumdur.

#### **2.4.1.2. Nörojenik Kontrol**

Metabolizma ve akım ilişkisi, mekanizmayı tam olarak açıklamamaktadır. Bu iki etken üçüncü faktörle düzenlenebilmektedir. Perivasküler innervasyon bu rol için adaydır. Bunun önemi, kranial ganglionlardan serebral arterlere, arteriyollere, venlere sadece ekstrensek sinirler sağlamak değil, aynı zamanda intraserebral damarlara giden nöronlar olarak da rol oynar. Çeşitli agonist ve antagonist nörotransmitterlerin sistemik uygulamaları SKA'da çok önemli etkiler oluşturmamasına rağmen, deneylerde kan-beyin bariyeri bozulduğuna dair belirgin değişiklikler görülmüştür. Ekstrensek sinirler, intrensek sinirler ve intrensek beyin alanlarının hepsi serebral damarlara bağlanarak etki edebilir (17).

Serebral damarların nörojenik kontrol teorileri, beynin büyük damarlarını innerve eden efferent sinirlerin üzerinde yoğunlaşmıştır. Köken ve transmitterleri farklı üç tip ekstrensek sinir sistemi tanımlanmıştır.

Birincisi sempatik nöronlar, temel olarak süperior servikal gangliondan köken alır. Bu nöronlar, vazokonstruktör olan norepinefrin ve nöropeptid-Y içerir (20).

İkincisi, otik ganglion ve sfenopalatinde yer alan parasempatik sistem, asetil kolin içerir ve sıklıkla vazodilatör olan substans P (SP), kalsitonin gen related peptid (CGRP) içerir (17,22).

Üçüncüsü, trigeminal ganglionlardan köken alan duyu liflerinden oluşmaktadır. Bunlar her ikisi vazodilatör olan substans P (SP), kalsitonin gen related peptid (CGRP) içerir (17).

Beyin damarlarını innerve eden nöron liflerinin çoğu sempatiktir. Metabolik ihtiyaçların arttığı ve SKA'nın düşük olduğu durumlarda fonksiyonel olarak ortaya çıkar ve arteriyel hipertansiyon oluşturarak etki eder (23).

Parasempatik sinirler akımın tonik kontrolünde önemli bir rol oynamamaktadır. Ancak ağrıya bağlı vazodilatatör yanıtlarda etkileri saptanmıştır (24). Trigeminal sinirler, hipertansiyon ve epilepsi gibi hastalık durumlarında SKA'ı arttırarak etki edebilmektedir (25). Bu sinir liflerinin çokluğuna rağmen, SKA'nın primer olarak düzenlenmesi, lokal metabolizma ile ekstrensek sinirlerin minör modülasyonu ile olmaktadır. Bu periferik sinirlerin normal aktivite sırasında serebral dolaşımı nasıl etkilediği ve katkıları net olarak bilinmemektedir.

Serebrovasküler kontrol, kısmen medulla oblongatadaki intrinsek nöral sistemle regüle olmaktadır ve damar duvarları ve/veya endotelyuma tamamen bağlı değildir.

### 2.4.1.3. Karbondioksit ( $CO_2$ )

Parsiyel Karbondioksit Basıncındaki ( $PaCO_2$ ) değişikliklerin belirgin vazodilatasyona neden olduğu iyi bilinmektedir (26). SKA ile  $PaCO_2$  arasında ilişki mevcuttur,  $PaCO_2$  25-60 mm Hg arasında olduğunda, her 1 mmHg  $PaCO_2$  basınç değişikliğinde, SKA yaklaşık %4 değişmektedir (27).

$PaCO_2$ 'nin neden olduğu akım değişikliği 2 dakikada oluşmakta ve yeni plato değerine 12 dakikada erişmektedir (28). Bu düzenleme mekanizmalarının  $CO_2$ 'in tek başına yaptığı direkt etkiden çok, çevredeki perivasküler düz kas hücrelerinin pH değişikliğinin bir fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (29). Vasküler düz kas hücrelerinde hidrojen iyonlarının da direkt etkileri vardır, pH'daki lokal değişiklikler, noradrenalin gibi diğer ajanların vazomotor yanıtları düzenleyerek, damar çapında yaptıkları değişiklikleri düzenleyebilirler (30). Sistemik  $PaCO_2$ 'deki değişiklikler, karotid arterdeki kemoreseptörler tarafından düzenlenir ve bu mekanizma refleks yollarıyla etkilenebilmektedir. Tegmental retiküler formasyonunda lezyon oluştuğunda  $PaCO_2$  değişikliklerine serebrovasküler yanıtların azaldığı gösterilmiştir (31). Son yıllarda araştırmacılar, endotelyum deriveli gevşetici faktörle  $CO_2$ 'in serebral dolaşımında güçlü etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (32).

$PaCO_2$ 'deki değişiklikler uzadığında serebral kan akımında kronik adaptasyon oluşur ve kan akım değişikliğinden yaklaşık 36 saat geçtikten sonra bile değişiklik öncesi düzeyine döner.  $PaCO_2$  70 mmHg düzeyinde iken

maksimum vazodilatasyon oluşur, PaCO<sub>2</sub>'in bunun üzerinde artması durumunda SKA artışı olmaz. Benzer bir şekilde PaCO<sub>2</sub> 20 mmHg altına düştüğünde SKA daha fazla azalmaz. Bu düşük PaCO<sub>2</sub> düzeyinden klinik uygulamalarda kaçınılır, kan akımının azalmasını doku iskemisi izleyebilir.

#### 2.4.1.4. Otoregülasyon

SKA, serebral perfüzyon basıncı (SPB) ile serebrovasküler rezistans (SVR) arasındaki ilişki ile belirlenir.

$$SKA=SPB/SVR$$

SPB= ortalama arteriyel kan basıncı (OAKB)-intrakraniyal basınç ve sagittal sinüs basıncı.

$$OAKB=1/3 (\text{sistolik basınç-diyastolik basınç})+ \text{diyastolik basınç}.$$

Fizyolojik koşullarda intrakraniyal basınç ve sagittal sinüs basıncı, sistemik arteriyel basınçla kıyaslandığında önemsizdir ve SPB kabaca OAKB'na eşittir (33). Böylece, serebral kan damarlarının çap değişiklikleri SVR'da belirgin değişiklikler yapar. SPB'daki bir azalış prekapiller rezistans damarların dilatasyonuyla oluşurken, artış konstruksiyonla oluşur. Serebral rezistans damarlarının konstruksiyon dereceleri büyük varyasyonlar gösterir, ortalama hemisferik SKA sabit değerde tutulur, istirahattaki erişkin insan beynine dakikada (45-60 ml) ortalama 50 ml/100gr kan akımı olur.

Endotelyuma bağlı mekanizmaların damarsal tonusta primer rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır ve bu durumun otoregülasyonun miyojenik hipotezinin temelini oluşturduğu düşünülmektedir. Endotelyum, vazoaaktif maddelerin salınımına yol açan hemodinamik güçlerin bir transdüseri olarak işlev görmektedir (34). Endotelyum deriveli serbestleştirici faktörün (EDRF) sentezi, hem nitrik oksid (NO) hem de L-arginin amino asid kökenli moleküllerle açık olarak ilişkilidir ve damarsal tonus üzerinde etkilidir (23,26). Bu etkinin mekanizması; EDRF/NO ile çözülebilir guanilat siklazın uyarılmasıyla, damarların düz kaslarındaki siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyi artar ve damarlar gevşer (35). Geniş serebral arterler ve pial arteryollerde, in vivo asetilkolin uygulamasına karşılık olarak nitrik oksid sentaz tarafından NO oluşturulur, NO oluşması; N- monometil-L-arginin (L-NMMA) gibi nitrik oksit

sentaz enziminin kompetatif antagonistiyle bloke olabilir (36). Sıçanlarda benzer bir şekilde NO sentaz antagonistlerinin intravenöz uygulanmasının OAKB'da %40 artışa ve pial arteriyollerin lümen çaplarında %60 daralmaya neden olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (37). Bu L-arjinin/NO/cGMP yolunun vasküler tonusun kontrolünde kritik bir rolü vardır ve giderek otoregülatör yanıtların dominant medyatörü olarak kabul edilmeye başlanmıştır (37,38).

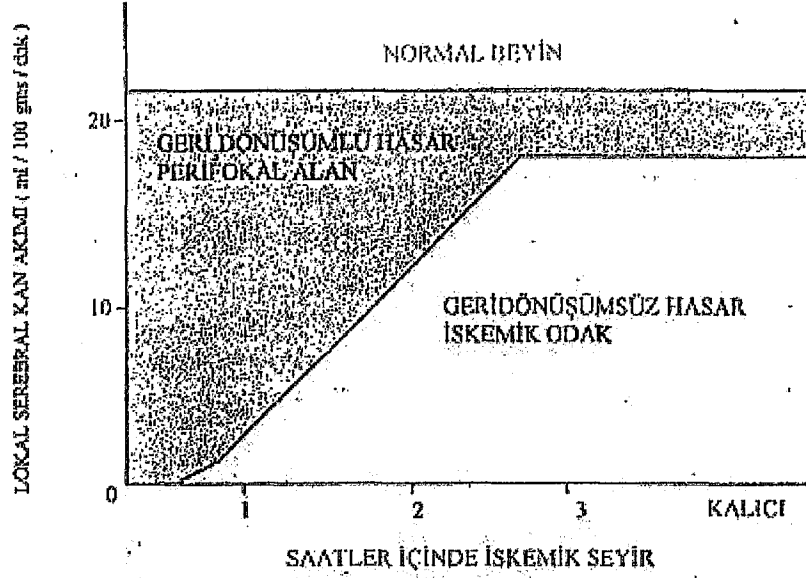
Beyinde, otoregülasyon yoluyla OAKB 60-150 mmHg arasında değişmesine rağmen SKA'da ciddi değişiklikler oluşmaz (39). Baroseptif reflekslerin, homeostatik mekanizma olarak olaya eklenip serebral otoregülasyonun düzenlenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (17). Otoregülasyonun üst ve alt sınırını etkileyen bir çok etken vardır. Bunlar; sempatik sinir aktivitesi, PaCO<sub>2</sub>, farmakolojik ajanlardır. En önemli faktör ise kronik arteriyel hipertansiyondur.

Hastanın serebrovasküler durumunun bilinmesi, serebrevasküler cerrahi sırasında geçici damar oklüzyonu planı yapılırken yardımcı olmaktadır. Bazı deneysel çalışmalar, aralıklı geçici oklüzyonların tek ve uzun süreli oklüzyondan daha az hasar verdiğini ortaya çıkarmıştır (40). Diğer deneysel çalışmalarda normotansif ve hipertansif hayvanlarda, aralıklı oklüzyon çalışması yapılmış ve hipertansif hayvanlarda iskeminin daha fazla geliştiği gösterilmiştir.

#### **2.4.2. Kritik Serebral Kan Akımı Eşikleri**

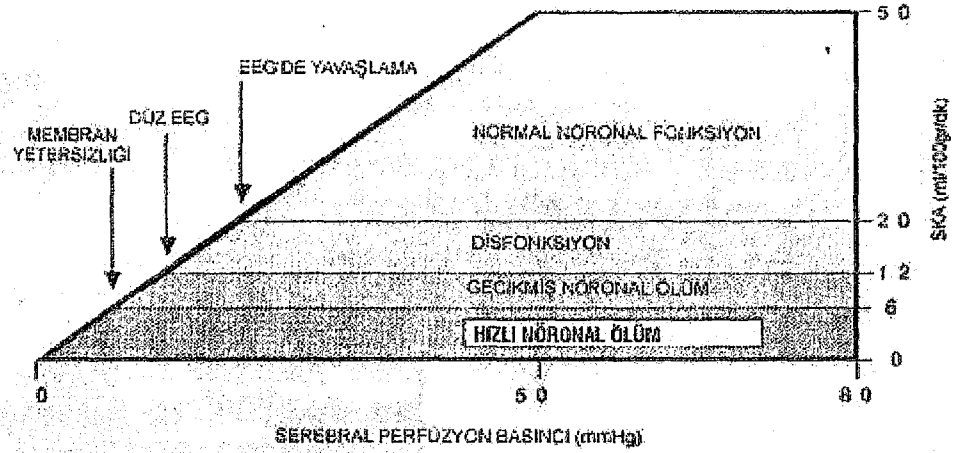
Modern elektrofizyolojik teknikler ile serebral kan akımının tam olarak belirlenmesi, nöronal fonksiyon ile doku canlılığı ve bölgesel serebral kan akımının kritik düzeyi arasındaki ilişkinin anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Akım azalması ve süresi iskeminin ağırlığını tayin eden en önemli etkenlerdir. (Şekil:1)(41).





**Şekil 1:** Fokal serebral iskemiyi takiben gelişen iskemik hasar miktarının, zamanla ilişkisi.

Bazı nörofizyolojik değişikliklerin, serebral kan akımının azalmasını takiben oluştuğu bulunmuştur. Normal SKA 45-60 ml/100gram/dakika'dır. SKA, hafif anestezi alan ve normotermik kişilerde, 20-25 ml/100 gram/dakika düzeyine düştüğünde EEG aktivitesinde değişiklik olmamıştır, bu düzeyin altına düşmeye başladığı zaman EEG aktiviteleri yavaş yavaş kaybolmaya başlamaktadır, SKA 15 ml/100 gram/dakikaya düştüğü zaman uyarılmış elektriksel kortikal yanıtlar kaybolur. SKA 10-12 ml/100 gram/dakikaya düştüğünde iyon dengesi kaybolur, EEG izoelektrik hale gelir ve bu düzey irreversibl hücre hasarının başladığı kritik eşik değer olarak kabul edilir (Şekil 2)(42)



**Şekil 2.** :Serebral kan akımı, serebral perfüzyon basıncı ve nöronların fonksiyonel durumları arasındaki ilişki

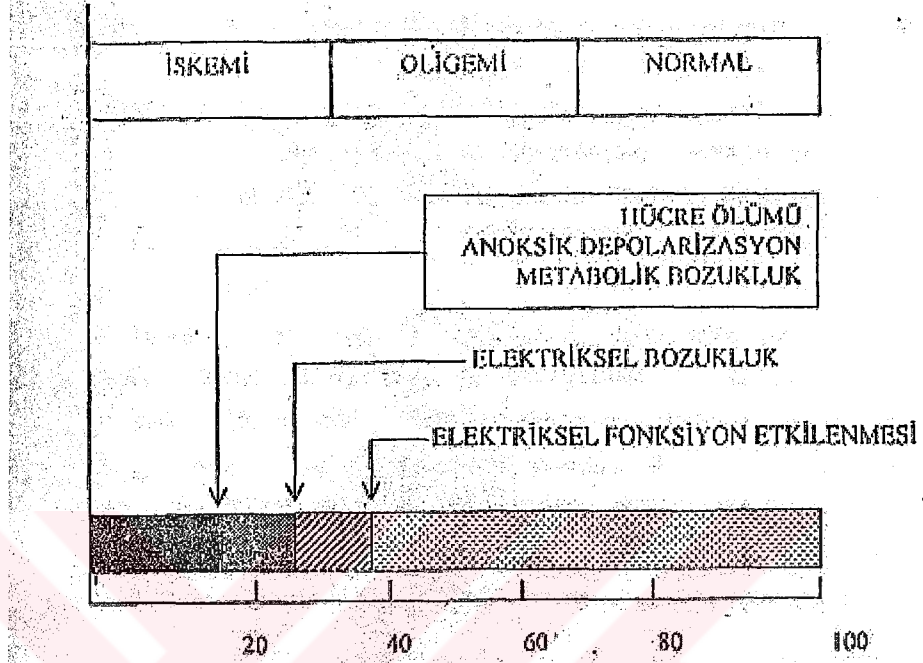
Serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya yansımaları Tablo-2'de özetlenmiştir (43).

**Tablo 2.** İskemide serebral kan akımı düzeyindeki azalmaların dokuya yansımaları

Serebral Kan Akımı (SKA) (ml/100 gr/dakika)	Dokudaki Sonucu
35-55	Bozulmuş protein sentezi
40-50	Selektif gen ekspresyonu
25-35	Azalmış glukoz kullanımı
20-30	Uyarıcı aminoasid salınımı, asidoz
15-30	ATP azalması
10-15	İyon denge kaybı ve anoksik depolarizasyon

Değişik hayvan türlerinde, MCAO'nun deneysel çalışmalarında, serebral kan akımının etkilenen alanın dışında normal olduğu, komşuluğundaki alanda hafif iskemik değişikliklerin olduğu, oklüzyonun odağında iskeminin yoğun olduğu gözlenmiştir (44,45,46). Bu durum, kollateral kan akımının fonksiyonel kapasitesine ve boyutuna bağlıdır. Normal perfüzyon ve iskemik odak arasındaki geçiş bölgesi, yani perifokal alan, yalnızca homeostatik mekanizmalara bağlı olarak etkilenmektedir (4,47).

Farklı hücresel fonksiyonlar, spesifik minimum kan akımı seviyesine gereksinim duyarlar. Bu alanların etkilenmesi kan akımı azalması düzeyine bağlıdır. Bazı fonksiyonel bozukluklar, öncelikle bu akım eşiğinin altına düşüldüğünde oluşur (Şekil 3) (48).



**Şekil 3:** Rölatif serebral kan akımıyla ilişkili olarak hücresel fonksiyonlar ve canlılığındaki değişiklikler.

## 2.5. İskemik Penumbra Ve Terapötik Zaman Aralığını Etkileyen Faktörler

### 2.5.1. İskemik Penumbra

Bir damarın tıkanması ile oluşan serebral iskemide, şiddetli iskemi altındaki merkezi çekirdeği, perfüzyonu kolleteral dolaşım ile korunan ve kan akımının daha fazla olduğu bir bölge sarar. Kollateral damarların yeterliliği, iskemik bölgenin büyüklük ve şiddetini büyük ölçüde etkilemektedir. Kollateral damarlardaki akım ise serebral perfüzyon basıncına bağlıdır. Böylece, sistemik arteriyel kan basıncındaki düşme, iskemik bölgenin genişliği ve şiddetinde önemli bir artışa neden olacaktır. İskemik alanın genişliği ve şiddetini etkileyen bir diğer faktör de iskeminin süresidir. Eğer çok kısa bir süre içinde perfüzyon sağlanır ve kan akımı normal değerlere çıkar ise iskemik alandaki nöronların fonksiyonları geri dönebilir. Kısa sürede yeterli perfüzyon sağlanamaz ise, 10-12 ml/100 gr/dk düzeyindeki kan akımında, oksijen seviyesinin yetersizliği

nedeniyle mitokondriyal metabolizma inhibe, anaerobik glikoz metabolizması aktive olur. Böylece laktik asit düzeyi yükselip pH düşer ve intrasellüler-ekstrasellüler asidoz gelişir. İyon homeostazını sağlayan enerjiye bağımlı hücre membran fonksiyonu giderek bozulur ve iyonik akımlar artar. Potasyum ekstrasellüler alana, sodyum, kalsiyum ve bunlarla birlikte suyun intrasellüler alana girişi başlar. Böylece ekstrasellüler potasyum artar, kalsiyum düşer, hücre membranı depolarize olur ve bunu hücre ölümü izler. Reperfüzyon olsa bile nöronların geçici serebral iskemik döneme dayanabilmeleri, iskeminin derecesi ve süresine bağlıdır. Ayrıca yaş, glikoz miktarı, ateş ve farklı nöron popülasyonlarının değişen duyarlılıkları gibi etmenler de iskemik toleransı etkiler. Akut iskemi sırasında oluşan nöronların fonksiyonsuz ancak canlı ve reperfüzyon ile kurtarılabilir halde oldukları fizyopatolojik duruma **iskemik penumbra** adı verilir. Bu alanlar günümüz tedavi yaklaşımlarının temel hedefini oluşturur. Bu alanların zamanla reperfüzyon veya farmakolojik ajanlarla tedavi edilmemesi durumunda kaçınılmaz olarak infarkt gelişecektir SKA 6 ml/100 gr/dakikaya indiğinde irreversibl membran fonksiyon bozukluğu olur ve direkt olarak kortikal cevaplar kaybolur (42).

'İskemik penumbra', ilk kez Symon ve arkadaşları (49) tarafından 'spontan ve uyarılmış elektriksel potansiyellerin olmadığı, ancak membran potansiyellerinin ve iyon dengesinin korunduğu, azalmış kan akımı olan iskemik bölge' olarak tanımlanmıştır. Hossmann ve arkadaşları (50) bu tanımı 'kan akımının azalmış olduğu ancak enerji metabolizmasının korunduğu bölge' olarak geliştirmiştir. Girisberg ve Pulsinelli (51) ise, penumbrada enerji metabolizmasının temelde korunabildiğini ancak aralıklarla bozulduğunu bildirmişlerdir.

Bir penumbral alanın fiziksel şeklini çizmek güçtür. Bu alan SKA'nın azaldığı ve hücre fonksiyonlarının baskılandığı fakat iyon dengesiyle yaşamını sürdüren hücrelerden oluşmaktadır. Strong ve arkadaşları azalmış SKA, baskılanmış EEG ile karakterize bir periferik alan tanımlamışlardır. Bu alanda , ekstrasellüler potasyum orta derecede artmış ve nöral nekrozis yayılımı iki saat içinde oluşmuştur (52). MCAO ile oluşan yoğun iskemik odak, ACA ve PCA ile iyi beslenirse akımın kademeli olarak çok düşükten normale kadar düzeleceği,

hücre hasarının kademeli olarak azalacağı, infarkt alanının daralacağı, nöronal nekrozisin seyrekleşeceği ve normal dokunun oluşabileceği iddia edilmektedir. Böylece hayvanlarda MCAO'da akut SKA ölçümü, çok keskin sınırla normal ve kötü perfüze olan dokuları gösterir (53). Ayrıca, insan ve primatlarda infarkt ve normal doku arasında çok keskin geçiş bölgesi vardır. Fakat nekrotik nöron dağılımını içeren bir perifokal alanın kanıtı azdır (54). Bu bilgilerden ortaya çıkan sonuçlardan biri, eğer ilaçlar penumbradaki hücreleri korursa iskemik hasar iyileştirilebilir ve dokunun kurtarılması mümkün hale gelebilir.

Sonuç olarak, deney hayvanları ve insanlardaki serebral hemodinamik ve metabolizma ölçümleri, iskemik serebrovasküler hastalıkların fizyopatolojisine önemli veriler sağlamıştır. Değişik hayvan türlerinde serebral kan akımının normal değerleri farklı olmasına karşın, kritik kan akım değerleri bazı hayvan türleri ve insanlarda benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, çalışmalarda hayvan türlerinin çeşitliliği, anestezinin etkileri ve ilerleyici aterosklerozun doğası gibi etkenler hayvanlardan sağlanan verileri her zaman için insanlara uygulamaya olanaksız kılmaktadır (42).

### **2.5.2. Terapötik Zaman Aralığı**

Pozitron Emisyon Tomografi (PET) ve Diffüzyon ve Perfüzyon MR (DWI /PWI ) verileri, insan inmelerinde, deney hayvan modellerinde olduğu gibi bir penumbra dokusunun mevcut olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak deneysel modellerden farklı olarak, insan penumbra dokusu daha uzun süre mevcudiyetini koruyabilmektedir. Bu bulgular iskemik inme tedavisinde, beyni korumaya yönelik önlemlerin ön planda olduğu dinamik bir yaklaşım kavramını ortaya çıkarmıştır. Penumbra dokusunun en geniş olduğu dönem inmeyi takiben en erken dönem olduğu için, tedavi yaklaşımları sabit bir terapötik zaman aralığına bağlanmamalı, mümkün olan en erken dönemde yapılmalıdır. Günümüz nöroprotektif ilaç çalışmalarında terapötik zaman aralığı genellikle ilk 6 saat olarak ayarlanmaktadır. Bu, deney hayvan modellerinde en son koruyucu etkinin izlendiği 3. saat ile insan PET çalışmalarındaki daha uzun zaman aralıkları arasında yer alan, ampirik olarak belirlenmiş bir zaman noktasıdır. Ancak, 12 hatta 24 saat içerisinde verilen nöroprotektif ajanlarla yapılan klinik çalışmaların bazı alt grup analizlerinde faydalı etki gözlenmesi, penumbrayı

korumaya yönelik tedavi penceresinin aslında 6 saatten daha geniş olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber, intravenöz ve intraarteriyel yollardan yapılan reperfüzyona yönelik işlemlerde, tedavi penceresi sabittir ve sırayla 3 ve 6 saat olarak belirlenmiştir. Bu zaman noktaları aşıldığında, kabul edilebilir sınırların dışında semptomatik kanama meydana gelir. Bu nedenle tedavi penceresi, "penumbral pencere" ve "reperfüzyon penceresi" olarak iki farklı başlık altında ele alınmalıdır. İnsanlarda penumbral tedavi penceresini belirleyen en önemli unsur, kollateral dolaşımın miktarıdır. Kollateral dolaşım kişiler arasında önemli farklılıklar gösterir. Aynı damarın benzer mekanizma ile tıkanıldığı iki hasta arasında bile kalıcı hasara giden doku miktarı arasında farklılık vardır. Erken dönemde yapılan DWI / PWI çalışmalarında, hastaların yaklaşık %20-30'unda hiç penumbra dokusu bulunmazken (penumbrasız çekirdek), bazı grup hastalarda da iskemik saha içerisinde hiç nekrotik alan bulunmaması (çekirdeksiz penumbra), kişiler arası farklılıkların ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Kollateral dolaşımı olmayan ve bütün iskemik sahada kalıcı hasar gelişmiş olan bir hastada herhangi bir tedavi penceresinden bahsedilemeyeceği gibi, yeterli kollateral dolaşımı olan ve henüz hiç kalıcı hasar gelişmemiş hastalarda tedavi penceresini kısa ve sabit bir aralıkla sınırlamak gerçekçi değildir. Modern görüntüleme yöntemleri ile hasta bazında elde edilecek objektif ve kantitatif bilgiler, gelecek inme yaklaşımlarında en önemli yol gösterici olacaktır (42).

### **2.5.3. Reperfüzyon ve Beyin Hasarı**

Normal koşullar altında, global veya ön beyin tipinde oluşan yoğun iskemiye takiben, genellikle kısa canlandırma zamanı vardır. Geçici MCAO oluşturulan iskemi modellerinde akım en iyi şekilde korunduğu için, canlandırma süresi daha uzun olmaktadır. Bununla birlikte bölgesel dokulardan dolayı, bölgeler arasında akım farklılığı oranı kontrol değerinin % 10'unun altında olabilmektedir ve penumbral doku yalnızca orta derecede akımla beslenebilmektedir. Çok erken reperfüzyonun, tamamıyla oluşabilecek hasarı engelleyebileceği önceden söylenebilirken, daha geç dönemde penumbral alan kurtarılabilen ve infarkt odağına dönüşmesi engellenebilmektedir (4).

Reperfüzyon modellerinin yeniden oluşturulmasıyla, yeniden canlandırma zamanı daha çok ayrıntılarla çalışılabilir. Sıçanlarda, 30 dakika oklüzyon periyodu modeli, genellikle kaudoputamene lokalize infarkta ve daha az oranda neokortekste kalıcı selektif nöronal nekrozise neden olmaktadır (55). İskemik lezyon, reperfüzyon işlemi 90 dakikadan sonra yapılırsa iyileşmez. Tüm bu ihtimaller sıçanlarda, yüksek serebral metabolizma oranını ve göreceli olarak kötü kollateral kan akımını yansıtmaktadır. Bu gerçek, sıçanlarda deneysel araştırmaların klinik bulgularla eşdeğer olduğunu izah etmektedir. Yukarıda söz edildiği gibi insanlara en çok benzeyen primatlarda daha uzun canlanma zamanı gösterilmiştir ve böylelikle reperfüzyon 3-6 saat gibi geç zamanlarda yapılırsa bile yararlı olabilmektedir.

Reperfüzyonda iskemik dokunun yeniden canlanma zamanı içinde akımın tekrar sağlanması durumunda, serebral iskemik doku oksijen teminiyle zarar görebilir, yaygın olarak 'reperfüzyon hasarı' denilen duruma yol açabilir (56,57). Reperfüzyonda çok çeşitli hücre, organel ve enzimler serbest radikal kaynağını oluşturmaktadır. Bu durum önceki on yıllarda oklüde MCA'in reperfüzyonu için tanımlanmıştı. MCAO'nu takiben reperfüzyonda, ağır doku şişmesi, sekonder dolaşım bozulması, özellikle vazojenik tipteki ödemin agreve olduğu tespit edilmiştir. Hasar, suyun osmotik ekivalanlarının (ödemi daha da arttırmaları), oksijenin (yaranın serbest radikallerin yapımını tetiklerler) tekrar sağlanmasına bağlı olabilir. Hasarlı beyinde reperfüzyonun, infarktı daha fazla genişletmesi veya kalıcı oklüzyona neden olması infarktın ölçüsüne bağlıdır(58).

#### **2.5.4. Penumbra'nın Enfarkta Dönüşmesi**

Kan akımının ileri derecede azalmış olduğu penumbra bölgesi zaman içerisinde nekroza dönüşür. Bu dönüşümde rol oynayan en önemli faktör hemodinamik bozukluklardır. Özellikle, kan basıncındaki ufak oynamalar, otoregülasyonun bozulmuş olduğu ve buna bağlı olarak akımın perfüzyon basıncına bağımlı hale geldiği iskemik alanlarda, bölgesel kan akımının fonksiyonel ile morfolojik bantlar arasındaki küçük aralığı aşmasına neden olur. Doku perfüzyonunun en önemli belirleyicileri, serebral perfüzyon basıncı (sistolik ile diastolik kan basınçları arasındaki fark), kan vizkozitesi ve ilgilenilen

bölgelerdeki arteriyollerin yarıçapıdır. Serebral damarlar, perfüzyon basıncının azaldığı durumlarda vasodilatasyon mekanizması ile kan akımını sabit tutmaya çalışırlar (otoregülasyon). Ancak iskemik beyin bölgelerinde, otoregülasyon mekanizması bozulur. Bu bozulma, damarların dilatasyon kapasitelerinde azalma ve maksimum dilatasyon durumunda bulunan damarların azalan kan ihtiyacını karşılamak için daha fazla genişleyememesi ile karakterizedir. Bu durum, elastik özellikleri olan canlı damar dokusunun metal bir su borusuna dönüşmesi şeklinde ifade edilebilir. Sonuç olarak, penumbra bölgesindeki kan akımı, sistemik kan basıncına ve kan viskozitesine bağımlı hale gelir. Kan basıncında azalma (antihipertansif tedavi) veya kan viskozitesinde artış (artmış hematokrit, fibrinojen, immünoglobulinler), serebral kan akımının azalmasına ve penumbra dokusunun kaybedilmesine yol açar. Ayrıca serebral iske mi sonrasında, endotel lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM-1), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve birçok inflamatuvar aracı moleküller Tümör Nekrozis Faktör a (TNF-a), İnterlökin 6 (IL-6) aktivitesinde artış olmaktadır. Damar içerisinde inflamatuvar hücre aktivasyonu, lökositlerin damar duvarına yapışmasına ve agregasyonuna neden olarak, kan akımının daha da azalmasına yol açar. Ayrıca iskemik bölgelerde, eritrosit deformabilitesinin azalması ile yavaş akıma bağlı pıhtılaşma odaklarının ortaya çıkması sonucunda da mikrodolaşım bozulur (42).

İnflamatuvar hücre aktivasyonunun en önemli sonuçlarından birisi lizozomal enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin ortama salınmasıdır. Lizozomal enzimler, direkt doku harabiyetine yol açar ve hücre membranı yıkım ürünlerinden yeni serbest oksijen radikallerinin meydana gelmesine neden olur. Serbest oksijen radikalleri de kalıcı hasarın büyümesine neden olurlar.

## **2.6. Bölgesel Serebral İskeminin Fizyopatolojisi**

MCAO'na bağlı iske mi, genel olarak iskemik odakta yoğunlaşırken daha az olarak da iskemik penumbral alanı da etkilemektedir. Odaktaki hücreler, genellikle hızla reperfüzyon sağlanmazsa aynı şekilde kalmaya mahkumdurlar. Aksine, penumbranın içerdiği hücreler risk altında oldukları halde en az 4-8 saat yaşayabilir durumda kalabilmektedir. Penumbradaki hücreler, reperfüzyon veya



ilaçlarla kurtarılabilir ve penumbral alana doğru infarktın genişlemesi engellenebilir. İnfarktın genişlemesinden sorumlu etkenler muhtemelen asidoz, ödem, potasyum-kalsiyum geçişleri, protein sentezinin inhibe edilmesidir (4).

İskemik lezyonun patofizyolojisi tartışması merkezinde, enerji tükenmesi vardır. İskemi, hücresel Adenozin Tri Fosfat (ATP) düzeyinin sürdürülebilmesine engel oluşturduğundan, membran bütünlüğü için önemli bir anahtar görevi yapan makromoleküllerin degradasyonuna neden olur. Bunlar; iyon dengesinin kaybı, hücrelerin içerdiği kalsiyum, sodyum, klor, osmotik su içeriği, intrasellüler ve ekstrasellüler pH'ın azalması ile sonuçlanan metabolik asitlerin yapımıdır.

Büyük bir olasılıkla hücresel kalsiyum dengesinin kaybı iskemik hücre zedelenmesi patogeneğinde en önemli rolü oynar. Serbest sitozolik intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu, ATP yetersizliğinden dolayı kalsiyum pompa işlevinin kaybı ve kalsiyuma karşı membran geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak artmaktadır. İskemide, kalsiyumun hücre içine akımı birçok yoldan olmaktadır. En önemli yollardan biri, glutamat ve depolarize presinaptik son uçlardan salınan eksitator amino asit (EAA) serbestleştirilmesi ile oluşan reseptörlerin aktivasyonudur. Bununla birlikte iskemi, intrasellüler kalsiyumun bağlanması ve yakalanmasını da engeller, böylelikle intrasellüler kalsiyumun artmasına katkıda bulunur.

İskemik dokuda ikinci anahtar olay anaerobik glukolizisin aktivasyonudur. Bu aktivasyonun temel nedeni oksijen yokluğunda mitokondrial metabolizma inhibisyonudur. Bununla birlikte diğer etkenler de muhtemelen katkıda bulunmaktadır.

Günümüzde patofizyolojik araştırmalardaki gelişmelere bağlı olarak iki alanda farmakolojik tedaviler düzenlendi.

Birincisi, kalsiyumun hücre içine aşırı girişini azaltmaya yönelik uğraşlar veya muhtemelen kalsiyumun hücre içine girişte rolü olan glutamat veya öteki EAA'lerin toksisitesini engellemektir.

İkinci yol, toksik serbest radikal madde veya non-radikal serbest maddelerin yapılmasıyla potansiyel yıkıcı etki yaratarak iskemiye yol açan olayları engelleyen ilaçlardır. Böylece tedavide kullanılacak farmakolojik ajanlar, bunlarla veya antagonist maddelerle ilgili olabilir.

Hücrel enerji bozukluğu görüşü, iskemik araştırmaların temelini oluşturur. Büyük bir olasılıkla hücre nekrozu, enerji metabolizmasını zedelemekte veya bozmaktadır (59). ATP ve diğer nükleozid trifosfatların (stidin trifosfat ve üridin trifosfat gibi maddeler) sentez bozukluğundan dolayı, hücrelerin yaşamları üç yolla tehdit edilmektedir.

Birincisi, enerji kaynağının eksikliği veya tamamen yokluğu anaerobik glikolizisi uyarır, intra ve ekstrasellüler asidoza yol açar. Asidoz iskemik dokunun tekrar yaşaması veya iyileşmesi için potansiyel bir tehdit oluşturur.

İkinci yol, enerji bozukluğu iyon dengesini bozarak iskemik dokunun yaşamını tehlikeye atar. İyon denge bozukluğunun iki bileşeni olan sodyum ve klor hücre içine girer, beraberinde suyu ve kalsiyumu osmotik güçle hücre içine girmeye zorlar. Bu major patolojik olaylar asıl rolü oynamaktadır.

Enerji bozukluğunun üçüncü sonucu, hücrenin yapısal bütünlüğünü tehdit etmesidir. Yüksek enerjili fosfatlara, makromoleküllerin tekrar sentezlenmesi ve diğer enerji gerektiren olaylar için ihtiyaç duyulurken, temin edilmemesi durumunda hücre yapılarının bozulmasına yol açar. Bu alandaki araştırmalar, genellikle lipid ve protein üzerinde yoğunlaşmıştır. ATP sentezi bozukluğunda, mikroflaman, mikrotubuli gibi hücre iskelet yapılarının proteolitik yarıklarına ve onların hücre membranları ile bağlantılarının bozulmasına yol açtığı vurgulanmıştır (60). ATP sentez bozukluğunun öteki etkisi, fosfolipidlerin degradasyonu nedeniyle lizofosfolipid, diaçilgliserid (DAG's), araşidonik asitleri içeren serbest yağ asitleri gibi yapıların bozulup birikmelerine yol açmasıdır (59). Bununla birlikte, birçok degradasyon enzimi içeriği kalsiyumla aktive olur. Bu yapıların bozulması ATP kaybından ve kalsiyumun yoğunluğunun artmasından dolayı olmaktadır.

İskemide hücre ölümünün ve hücre disfonksiyonunun ana sebebi ATP sentezinin hatalı yapılmasıdır. Tek başına enerji bozukluğu, hücrelerin yaşamlarını, hücrelerin yapısında ve fonksiyonunda anahtar rol oynayan makromoleküllerin tekrar sentezini engelleyerek veya yavaşlatarak tehdit etmektedir. Bu tehditler, enerji bozukluğunun, iyon dengelemesi ve asit-baz ayarındaki olumsuz etkileriyle pekişmektedir. İyon akımının bozulmasından ve laktat ile H<sup>+</sup>'in glikolitik yapımından dolayı içe akım başlayarak kalsiyumun

intrasellüler serbestleşmesine, intra ve ekstrasellüler asidoza neden olur. Diğer olaylar lipolizi, proteolizi, protein sentezinin inhibisyonunu kapsamaktadır. Bu olaylar, inme lezyonunun yoğun iskemik odağında hızlı hücre ölümüne yol açarken, yoğun iskemik penumbra hücrelerin yaşamlarını daha az tehdit eder.

Herhangi bir MCAO modelinin oluşturulmasının hemen ardından başlayarak gelişme gösteren fizyopatolojik olaylar açısından türlere özgü belirgin bir değişiklik tanımlanmamıştır. Yani iskeminin seyri gerek primatlarda gerekse diğer deney hayvan türlerindeki fokal serebral iskemi modelleri için hemen hemen aynıdır. Fokal iskemik zedelenmenin reversibl durumdan irreversibl duruma dönüşmesindeki muhtemel mekanizmalar başlıca şu başlıklarda incelenebilir.

#### **2.6.1. Dolaşımdaki ve kan akımındaki değişiklikler**

MCAO'un hemen sonrasında, bu arterin beslediği beyin bölgelerindeki dolaşım bir süre daha normal biçimde sürmektedir. Deneysel çalışmalarda kullanılan intravenöz fluorescein ve karbon black uygulamalarıyla bu olay gösterilebilmiştir. Oklüzyondan yaklaşık bir saat sonra iskemi sahasının çevresinde bölgesel bir otoregülasyon kaybı ortaya çıkar. Sonraki saatlerde, serebral korteks yüzeyindeki değişiklikler venöz kanın koyulaşması, kan akımında yavaşlama ve kan elemanlarının agregasyonu biçiminde ortaya çıkar ve bunları bölgesel solukluk, arteriyel spazm, venlerde kırmızı kanın belirmesi , perivenöz hemorajiler ile serebral ödem izler (61).

Tek bir arterin oklüzyonundan sonra gelişen SKA değişiklikleri sabit bir düzeyde olmamaktadır. Bunun nedeni değişik yaş ve türdeki hayvanlar üzerinde uygulanan yöntemlerin değişik olmasıdır. SKA değişiklikleri ile yapısal hasardaki belirgin heterojenite tek arter oklüzyonunun karakteristiğidir. Arteriyel oklüzyondan sonra SKA'daki düşüş için ilgili arterin kanlanma sahasındaki rezistan damarların tümüyle dilate olması gerekir. Fokal iskemide kan akımının bölgesel regülasyonundaki bozulmanın nedenlerinden biri de bu olmaktadır (62).

Deney hayvanlarındaki fokal serebral iskemi modellerinde izlenen nörolojik defisitler doku değişiklikleri ile yakından bağlantılıdır. Gri cevherde ortaya çıkan SKA düşüşü oklüzyondan sonraki ikinci günde en yüksek düzeyde olmaktadır beyaz cevherdeki sonuçlar oldukça değişiklikler gösterir. Hiperemi, oklüzyondan sonraki 15. güne kadar varlığını sürdürebilir. Hipereminin histopatolojik karşılığı iskemik hasardır. Histolojik değişiklik gösteren sahalarda SKA genellikle azalmış olmasına karşılık bu ikisi arasında her zaman bir korelasyon beklemek doğru değildir (63).

### **2.6.2. Vasküler reaktivite değişiklikleri**

İskemi sahasındaki kan akımının ortalama arteriyel kan basıncına göre hipotansif ya da normotansif düzeylerde seyretmesi sonucunda serebral otoregülasyon değişiklikleri ortaya çıkmaktadır (64). MCA üzerinde yaratılan spazmın bölgesel SKA'da spazm şiddetiyle orantılı olarak ve iskemik nekroz gelişiminden çok daha önce dolaylı değişikliklerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Arter çapında normale geri dönüş olsa bile bölgesel SKA'nın kalıcı depresyonu sonucunda infarkt gelişimi kaçınılmazdır (65). Oklüzyon distalindeki arter sahasındaki kan damarlarında  $paCO_2$  artışı ile hiçbir değişiklik görülmeyebildiği gibi paradoksal bir kontraksiyon da gelişebilmektedir (66).

Otoregülasyon, nörojenik ve metabolik mekanizmaların etkisi altında bulunan myojenik bir refleks olarak düşünülebilir (67).

### **2.6.3. Kan beyin bariyeri değişiklikleri, intrakranial basınç değişiklikleri ve serebral ödem**

Fokal iskeminin oluşmasından hemen sonra kan damarlarının normal tonusunu kaybetmesine bağlı olarak beyin hacminde ani bir artış ortaya çıkar. Bunun ardından ise muhtemelen enerji metabolitlerindeki bir yıkımın getirdiği 'metabolik ödem' gelişir. İskemiden sonraki 4-6 saat gibi geç bir dönemde ise proteinlere karşı olan vasküler permeabilite değişiklikleri sonucunda 'iskemik beyin ödemi' ortaya çıkar.

İskeminin ilk 3 saati boyunca su ve sodyum içeriğindeki artış gri cevheri etkiler. 12-48 saat sonrasında ise su retansiyonu ile sodyumun artışı beyaz

cevherde daha egemen bir hal alır (68). Serebral kortekste 12 saatte, putamende ise 24 saatte maksimal sıvı birikimi ortaya çıkar. 48 saat sonra, irreversibl parankimal zedelenmenin aksine, gri cevherdeki su retansiyonunda ve elektrolit anomalilerinde kısmi bir geri dönüş ortaya çıkabilmektedir. 12-48 saat sonra komşu beyaz cevher alanları progresif bir su artımı gösterir. Beyaz cevherdeki sodyum artışı ile potasyum düşüşü ancak 48 saat sonra gözlenmektedir (69).

Normalde kan beyin bariyerini geçmeyen maddelerin infarkt dokusunda belirgin bir artışı söz konusu olmaktadır. Bu artış MCAO'dan 4 saat kadar sonra başlamakta, 4-7 günde en üst düzeye ulaşmakta, 20 güne kadar da en yüksektedir. Ancak suyun ekstrasellüler mesafedeki dağılımı makromoleküllerle ve diğer maddelerle aynı oranda olmamaktadır. Serum proteinlerinin ekstrasvazasyonu ile ilişkili ödem, ancak saatler sonra irreversibl doku hasarı oluştuğunda ortaya çıkar. Kalıcı MCAO dolaşımdaki Evans Blue maddesinin 48 saat içinde ekstrasvazasyonuna neden olurken, en fazla 4 saat süreli bir geçici MCAO yaklaşık 2 saatlik bir reperfüzyon sağlandığında bu maddenin özellikle gri cevherde olmak üzere ileri derecede eksudasyonuna yol açar. Dolaşımdaki proteinlerin ilk 3 hafta içindeki ekstrasvazasyonu nekroz sahasının genişliği ile ilişkilidir. 3. haftadan sonra infarkt boyutu ile bağlantılı olmaksızın, kan- beyin bariyeri tekrar oluşur (69). MCAO'dan sonraki 6 saat içinde beyin mikrosirkülasyonunda albumin ve eritrosit geçişine bir obstrüksiyon görülmemesine karşılık karbon partiküllerinin geçişinde bir aksama ortaya çıkmaktadır (70).

#### **2.6.4. Histopatolojik değişiklikler**

MCAO sonrasında oluşan fokal iskemi sahalarındaki nöronal değişiklikler heterojen bir özellik gösterir ve olayın erken evresinde yalnızca spesifik nöronları ilgilendirir. (71).

Tek arter oklüzyonuyla oluşturulan fokal serebral iskemi, ilgili arter alanındaki nöronlarda belirgin yapısal değişiklikler oluşturur. Nükleoplazma ve sitoplazmadaki nükleik asitlerde solukluk (hayalet nöronlar), perikaryonda büzüşme ve yoğunlaşma (karanlık nöronlar), nükleer piknozis, sitoplazmik

eozinofili (kırmızı nöronlar), formaldehid pigmentinin presipitasyonu ve diğer muhtemel değişiklikler ortaya çıkar (Tablo 3) (72,73). Bu histolojik bulgular için 'iskemik hücre değişikliği' tanımı kullanılmakla birlikte, bölgesel iskemideki nöronal değişiklikler oldukça değişken ve aynı zamanda nonspesifik olduğu için 'akut nöronal zedelenme' tanımı daha açıklayıcı olmakta ve sıkça kullanılmaktadır.

MCAO'daki kan akımı değişiklikleri striatum bölgesinde yoğun, serebral kortekste ise ılımlı olarak tanımlanabilir. Bu olay, hemisfer yüzeyinde mevcut olan zengin kollateral bağlantıların bazal ganglionlarda bulunmayışı ile açıklanabilir (74).

MCAO sonrasında striatum ve insular kortekste ortaya çıkan morfolojik değişiklikler için başlıca iki tanımlamada bulunmak mümkündür.

Bunlardan ilki, sıklıkla bazal ganglionlarda görülen ve nöronları, glial hücreleri, vasküler elemanları içeren 'komplet nekroz'dur.

İkincisi ise sıklıkla kortekste görülen ve genellikle nöronlarla sınırlı kalan 'selektif nekroz'dur (75).

Benzer biçimde, gelişim halinde olan bir serebral infarkta iki ayrı doku cevabı alanı tanımlanmıştır. İki santral yerleşimli olan ve kan akımının en düşük düzeyde bulunduğu 'diffüz koagulasyon nekrozu'dur. İkincisi ise periferik yerleşimli olan, kan akımının bir dereceye kadar sağlanabildiği, astrositlerdeki reaktif değişikliklerle kapiller proliferasyon ve inflamatuvar hücrelerin varlığıyla karakterize bir bölgedir (76).

Nöronal değişikliklere ek olarak , fokal serebral iskemide sinaptik şişme, astrositer genişleme, ekstrasellüler mesafede artış ile muhtemel bir aksonal genişleme de ortaya çıkabilir. Multipl damar oklüzyonu ile geçici iskemi yaratılan sıçan beyinlerinde astrositlerin boyutlarında ve sayılarında artış olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (72,76).

**Tablo 3.** Sıçan beyinde fokal serebral iskemi sonrası meydana gelen hücresel değişiklikler (73).

İskemi Sonrası Zaman	Nöron	Astrosit	Mikroglia	Nötrofil	Makrofaj	Vasküler Hücreler
30 dakika	Büzüşme	Şişme:GFAP(+) Hücrelerde dejenerasyon				
1 Saat	Şişme; Vakoulizasyon; Kromatin birikmesi					Permeabilite artışı
6 Saat		İnfarkt çevresinde GFAP (+) hücre artışı		Endotelial Hücrelerin adezyonu; Beyin infiltrasyonu başlangıcı		Fokal nekroz
12 saat	Aksonal şişme; Kırmızı nöron;; Stoplazmik ve nükleer disintegrasyon; mitokondrial yoğunluk	İskemik bölgede aktivasyon				
1 Gün		Hayalet hücreler			Beyin infiltrasyonu başlangıcı	
2-3 Gün	Hayalet nöronlar			Beyin infiltrasyonu maksimum		Endotelial ve düz kas hücre proliferasyonu Kapiller tomurcuklanma formasyonu.
4-5 Gün			Uzak bölge aktivasyonu			
7 Gün		Gliozis odağı; Glial skar			Beyin infiltrasyonu maksimum	

#### **2.6.4.1. İskemik Nöronal Değişiklikler**

Kirino ve Tamura'ya göre iskemik nöronal değişiklikler dört evrede incelenmektedir.

**1. Evre:** Perikaryada vakoullerin görüldüğü mikrovakoulasyon dönemidir. Mikrovakouller oval veya yuvarlak bazofilik sitoplazma ile ayrılmış boşluklardır, perikaryon'da gelişigüzel dağılmışlardır, sıklıkla dentritlerde görülürler. Nükleus normal veya hafif küçülmüş olup nukleolus normal görünümündedir. Hücre büyüklüğünde belirgin farklılık gözlenmez. Mikrovakoullerin çoğunluğu şişmiş mitokondrialardır. Bu çalışmalardan çıkabilecek sonuç mitokondriaların iskemiye en duyarlı hücre organelleri olduğudur. Solunum ve oksidatif fosforilasyondan sorumlu enzim kompleksleri mitokondria içinde yer aldığından bu organellerin oksijen beslenmesinin iskemi ve hipoksi ile kesintiye uğramasına özellikle hassas olması doğaldır. Kombine ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik çalışmada mikrovakoullerin çoğunluğunun şişmiş mitokondria olduğu ve hasarlı nöronların şişmiş astrositik uzantılarla çevrili olduğu gösterilmiş (77,78,79).

**2. Evre:** Hücrenin daralarak nükleusun kenara itilip koyu boyandığı iskemik hücre değişiklikleri dönemidir. Bu evrede geniş nöronlar şişer, sitoplazma hiperkromatize olur, nükleus üçgenleşir, nukleolus bazen görülebilir. Küçük nöronlarda sitoplazma koyu boyanır, nükleus ve nukleolus seçilemez (77,78).

**3. Evre:** Hücre gövdesi çevresinde boşlukların oluştuğu iskemik hücre değişiklikleri dönemidir.

**4. Evre:** Hücre değişikliği homojenize olarak nöron parçalanır ve tam olarak absorbe olarak nöronal fagositoz ile sonlanır (79).

#### **2.6.4.2. İskemik Astrositer Değişiklikler:**

Astrositlerin iskemiye yanıtı nöronların yanıtına oldukça benzerlik gösterir. Ancak iskemiden sonra 7 gün geçtiğinde ortamdaki piramidal nöronların büyük çoğunluğu yıkıma uğradığı halde astrositler büyük oranda aktif olarak yaşamlarını sürdürmektedirler. Bu gözlemler iskemide nöron ve astrositlerin hücresel düzeyde yanıtlarının farklı mekanizmalar ile gerçekleştiğini



ve hatta belki de astrositlerin iskemiye dayanıklılığının nöronlara göre daha fazla olduğunu düşündürebilir.

Dört damar oklüzyonu ve 30 dakika sonunda reperfüzyonu yöntemi ile erken astrositer değişiklikler görülür.

40 dakika sonunda astrosit nukleusları hafifçe genişlemiş ve soluktur, sitoplazma ve proksimal uzantılar genişler, elektron mikroskopik incelemede mitokondriler olduğu anlaşılan çubuk şeklinde cisimler görülür. İskemik nöronların çevresindeki astrositik uzantılar şişmiş görünür. Reaktif astrositler sadece iskemik nöron değişikliklerinin olduğu alanlarda gözlenir, çevre beyaz cevherde görülmez.

3 saat sonra astrosit sitoplazması daha da genişlemiş, mitokondria sayısı artmış, nükleus daha büyümüş ve soluklaşmış görülür, çift nükleus ve mitotik figürler ortaya çıkar (80).

Oklüzyondan 2.5 saat sonra, astrositik uzantılar özellikle perikapiller alandan santrifugal bir şekilde yayılıp, kapillerden uzak alanlara yayılır.

12 saat sonra, endotel hücrelerinin şişmesi ve kapiller duvar nekrozu başlar. Birçok kapiller lümeninde polimorf nüveli lökositler (PMNL) görülür.

18 saat sonra, perivasküler şişme; endotel hücre nekrozu ve bazal membranın bulanıklaşması daha belirgindir. PMNL'ler kapillerin dışında da görülmeye başlar.

24 saat sonra, bazı kapillerde ileri nekroz diğerlerinde ılımlı değişiklikler görülür. Birinci grupta sitoplazmik organellerin yaygın değişikliklerine karşın endotelial sıkı bağlantılar korunur.

48 saat sonra, ekstrasvasküler mesafede yaygın sıvı birikimi, endotel hücrelerinde mitokondrial şişme, nükleer kromatinin kenara itilmesi ortaya çıkar.

3 gün sonra, sıvı ekstrasvazyonuna karşın ödemin olduğu sahalarda normal ultrastrüktür görülebilir.

İkinci hafta, birçok kapillerde ileri nekroz, duvarlarında fenestrasyonlar görülür (81).

Merkezi sinir sisteminde iskemi, cerrahi travma gibi durumlarda ortaya çıkan reaktif astrositler hipertrofik hücre gövdesi, genişlemiş nükleus, artmış

sitoplazmik lifler içerirler ve bir süre sonunda granül şeklinde parçalanarak yok olurlar (klasmatodentrozis) (82).

GFAP glial liflerin ana proteindir. Fibriler glia beynin hasara verdiği glial yanıttır. Astroglanın işaretlenmesi GFAP'nin immunohistokimyasal bağlanması ile kolaylaşmıştır. GFAP en önemli klinik uygulamasını astroglial hücrelerin ayrımında bulmuştur (83,84).

GFAP'de artmış yapım değişik patolojilere astrositlerin maturasyon ile yanıtının göstergesidir (85).

İmmünohistokimyasal boyama teknikleri günümüzün en sık kullanılan tekniklerinden birisi olmuştur. Tüm immünohistokimyasal tetkiklerde temel madde antikordur. İncelenilmek istenilen doku antijeninin geliştirilmiş olan antikor yardımı ile işaretlenmesi prensibine dayanan GFAP boyanmasında GFAP doku antijenidir ve hazırlanılan antikor ile işaretlenmektedir.

#### **2.6.5. Biyokimyasal ve Metabolik Değişiklikler:**

Fokal iskeminin erken devresinde, bölgesel kan akımındaki düşüşe bağlı olarak, metabolik yanıtlarda belirgin değişiklikler ortaya çıkar. Daha geç devrede, iskemik ve iskemik olmayan bölgeler arasında keskin bir metabolik ve hemodinamik sınır gelişir (86).

MCAO'dan sonraki ilk bir saat süresince laktat, pirüvat, AMP ve ADP gibi beyin metabolitlerindeki değişiklikler ilgili arter kanlanma sahasıyla sınırlı kalır.

Ancak bu değişikliklerin derecesinin veya dağılımının hangi düzeyde olacağı hakkında önceden herhangi bir tahminde bulunmak mümkün değildir (87). Oklüzyondan sonraki 2-4 saat içinde ise olayın reperfüzyon ile geriye dönüşümü mümkündür. Bu dönemde ATP düzeyi tedrici olarak normalin % 20'sine kadar düşmekte ve buna laktat düzeyindeki tedrici artış eşlik etmektedir. Bölgesel kan akımı ile laktat düzeyleri arasındaki korelasyon, fokal serebral iskemide otoregülasyon kaybı ile ortaya çıkan 'luxury perfusion' (lüks perfüzyon) durumunun laktik asid birikimi sonucu olduğunu desteklemektedir. Oklüzyon sonrasında oksijenin kullanımı belirgin bir biçimde azalmakta ve otoregülasyon kaybolmaktadır. Ancak oldukça uzun bir süre sonrasında otoregülasyonun tekrar düzelmesi umulabilir (88).

Arteriyel oklüzyondan yaklaşık iki saat sonra beyindeki lipide bağlı katyonlarda ani bir düşüş gözlenmiştir. Plazma membran disfonksiyonundan sorumlu nedenlerden birisi de bu olabilir (89).

Oklüzyondan yaklaşık 3 saat sonrasında ise c-AMP değişiklikleri ortaya çıkar (90).

İskemi fizyopatolojisinde biokimyasal değişiklikler iki fazda incelenir:

**Faz 1.:** İskeminin başlaması ile ortaya çıkar. EEG'de önce kısa bir artış ve ardından uyarılmış yanıtlarla EEG'nin birlikte kaybolması. Bu işlevsel kayıba ekstrasellüler ana iyonların konsantrasyonlarında ılımlı değişiklikler eşlik eder,  $H^+$  iyonundaki artış beyin asidifikasyonunun göstergesidir.

Komplet serebral iskemide bu fazın süresi beyindeki depo yüksek enerjili substratların yüksek düzeyi ile veya beyinin fonksiyonel aktivitesindeki veya serebral metabolizma hızında yavaşlama ile orantılı olarak uzayabilir (91,92).

İskeminin bu döneminde ortaya çıkan değişiklikler genellikle reversibldir. Bu dönem kısa sürdüğü durumda kalıcı nörolojik defisite yol açmaz. EEG aktivitesinin başlangıçtaki birkaç saniyelik artışı invitro anoksida gözlenen kısa küçük depolarizasyona karşılık gelir. Bu çok kısa süreli, EEG ve Uyarılmış Yanıt (UY) kaybından hemen önce, spike aktivitesi kaybolup sinaptik iletim işlemez duruma geldiğinde ortaya çıkan aktivite artışının kökeni henüz net olarak ortaya konulamamıştır (92).

İskeminin hemen başlangıcından sonra serebral korteksin ekstrasellüler mesafesinde  $H^+$  iyonunun hızlı bir artışı görülür. Bu hücrel mikroçevredeki asidifikasyonun nedeni intrasellüler mesafedeki laktik asid artışını tamponlamak amacı ile  $HCO_3^-$ 'deki artışa sekonder doku  $CO_2$ ' sinin artmasıdır. Ancak bir diğer görüş ise intrasellüler  $H^+$ 'i düzenleyen  $Na^+/H^+$  ve  $HCO_3^-/Cl^-$  değişiminin aktive olmasına bağlı  $H^+$  ve  $HCO_3^-$ 'ün hücre membranından geçmesi sonucunda erken ekstrasellüler asidifikasyon ortaya çıktığı şeklindedir (92-94).

İskeminin erken dönemi ekstrasellüler  $K^+$  ve  $Ca^{++}$  aktivitesindeki artış ile birlikte seyreder.  $K^+$ 'daki artış ATP'ye bağımlı  $Na^+/K^+$  pompasının progressif bozulmasına ve hücre membranının artmış  $K^+$  permeabilitesine bağlı ortaya çıkar.

$Ca^{++}$ 'daki artış ise  $Ca^{++}$  un hücre dışına çıkışındaki artış ve intrasellüler depolardan  $Ca^{++}$  salınımına bağlıdır. Bunların dışında  $Na^+$  ve  $Cl^-$  normal sınırlarda korunur. İn vitro elektrofizyolojik çalışmalar erken fonksiyonel kaybın artmış  $K^+$  iletimine bağlı ortaya çıkan nöronal hiperpolarizasyona eşlik ettiğini göstermektedir (92).

Normal durumlarda intrasellüler serbest  $Ca^{++}$  ekstrasellüler mesafeden birkaç kat daha azdır. Bu denge normal şartlarda hücre membranının  $Ca^{++}$ 'a impermeabl olması ile sağlanabilmektedir.

**Faz 2.** İskemi şiddetli ve uzun ise dakikalar içinde hücre membranı yoluyla iyonların iki yönlü yer değiştirmesi ortaya çıkar. Bu çarpıcı iyonik şift genellikle elektrofizyolojik olarak anoksik depolarizasyon şeklinde yansır ve ikinci fazın başladığını gösterir.

Diğer değişikliklerin yanı sıra önemli olarak intrasellüler serbest  $Ca^{++}$  düzeyinin uzun sürmesi ise irreversible hücre harabiyetine yol açar (93,95).

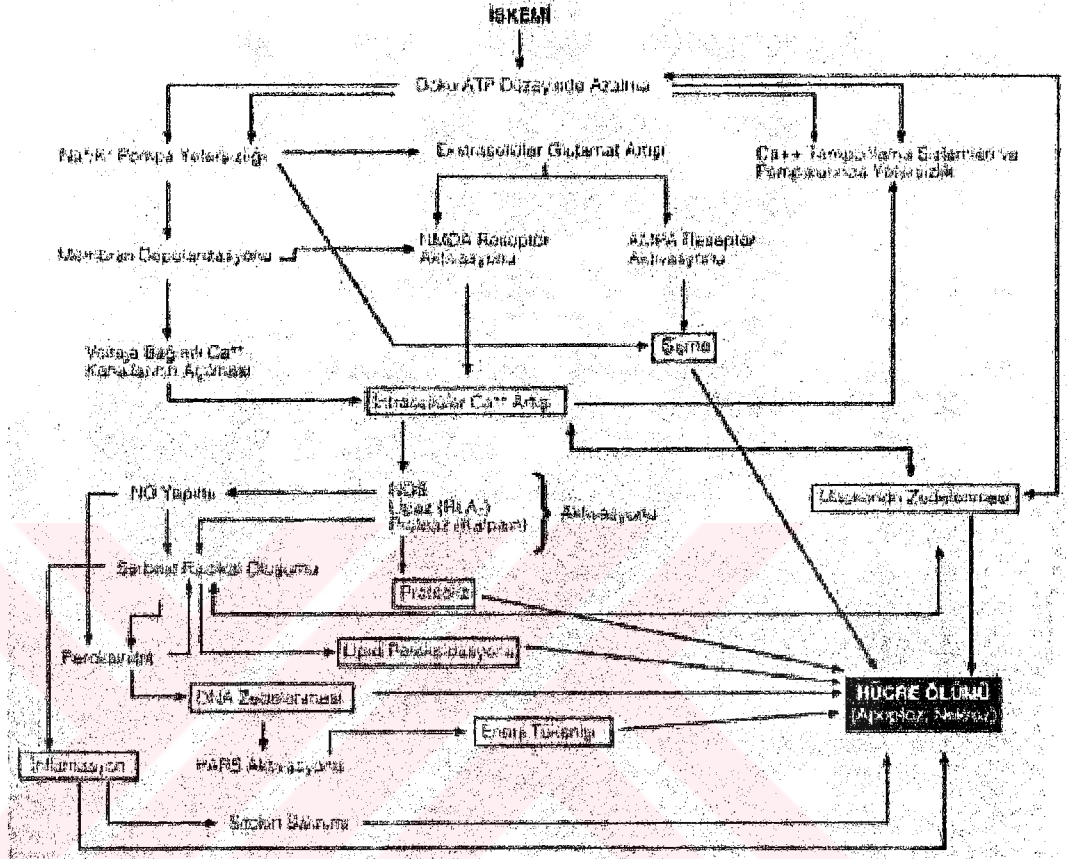
Anoksik depolarizasyon aşamasında hücre membran permeabilitesinde artış ortaya çıkar ve transmembran iyonik dengeler hızla bozularak hücre şişmesi meydana gelir. Bu sırada  $Ca^{++}$ 'un hücre içine girmesinin yanı sıra  $K^+$ 'un hücre dışına  $Na^+$  ve  $Cl^-$ 'un hücre içine göçü de görülür. Buna eşlik eden asit ve baz eşdeğerlerinin de şifti sonucu anoksik depolarizasyonun ani negatif şifti döneminde  $HCO_3^-$ 'de geçici artış gözlenir (92).

Anoksik depolarizasyon  $K^+$  düzeyinin 12 meq/l düzeyine yükselmesi ile tetiklenir. Ancak son bilgiler ekstrasellüler glutamat'ın da rolüne değinmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında çıkarabildiğimiz en önemli sonuç enerji yoksunluğuna eşlik eden eksitasyonun  $Ca^{++}$ 'daki artışın en büyük nedeni olduğudur.

İskemik kaskadın (olaylar zinciri) hücresel düzeyde açıklaması önemlidir. (Şekil-4) (96). Nöronal düzeyde hücresel işlev bozukluğunun ortaya çıkmasında ve nekrozun başlangıcında  $Na/K$  pompasında yetersizlik, nöronal membran depolarizasyonu, eksitator nörotransmitterlerin salınımı ve kalsiyum kanallarının açılımı rol oynamaktadır. Kalsiyumun hücre içine girmesiyle nöronal metabolizma ve normal fonksiyonlarda zarar oluşmaktadır. Kalsiyum nöron içine girince, çeşitli voltaj duyarlı ve reseptörle ilişkili kanallar aktive olur. N-Metil-D

Aspartat (NMDA), eksitator nörotransmitterler (glutamat ve glisin), bu kanallardan kalsiyumun daha fazla hücre içine girmesini sağlar. Bu farklı süreçlerle uzamış nöronal ölüm ortaya çıkabilir (97).



**Şekil 4.** Akut iskemik inmenin patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmaların şematik gösterimi(96).

İskemik hücre zedelenmesinin esas olarak üç tür ölüme yol açtığı bilinmektedir. Bazı hücreler eksitotoksik şişme, osmotik parçalanma ve nekroz ile fokal iskeminin başlangıç aşamalarında ölürken, bir kısmı apoptoz ile daha yavaş olarak ölmekte, diğer bir kısım hücrede apoptoz ve nekroz kombinasyonu bir ölüm yolu izlenmektedir. Nöronal nekrozun klasik morfolojik bulgusu, erken hücrel şişme ve takiben plazma ve nükleer membran bütünlüğünün kaybı ve daha sonra ortaya çıkan hücrel fragmentasyondur. Apoptozda ise nükleer büzülme, kromatin öbeklenmesi, nükleer segmentasyon ve apoptotik cisimcikler görülmektedir. Apoptozun biyokimyasal göstergeleri olan DNA fragmentasyonu, kaspaz-1, kaspaz-3 aktivasyonu ve Bax/ Bcl-2 oranında artış iskemik

hücrelerde tesbit edilmiştir. Kaspaz adı verilen proteolitik enzimler apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar (96).

#### **2.6.6.Serbest Yağ Asitlerindeki değişiklikler:**

Beynin serbest yağ asitleri (FFA) ve eicasanoid yapımı oksijenin normal olduğu durumda son derece azdır. İskemiden kısa bir süre sonra FFA ve araşidonik asit de belirgin artış ortaya çıkar. İyonik pompanın bozulması membran fosfolipidlerine bağlı olan kalsiyuma bağlı fosfolipazlardan araşidonik asid salıverilmesine yol açar. Enerji gerektiren bir işlem olan FFA'ların açıl koenzim A'ya dönüşümü gerçekleşemez. Reperfüzyonda ise artmış oksijen konsantrasyonu nedeni ile poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'ların peroksidasyonu ve radikal formasyonu kolaylaşır (Bu aşamanın ilaç ile engellenmesinde E vitamini gibi antioksidanlar kullanılır). Görüldüğü gibi normoksi durumunda bir denge halinde seyreden beynin antioksidan ve serbest radikal oluşumunun engellenmesi mekanizması post-iskemik reperfüzyon döneminde yetersiz kalır. Bu hiperperfüzyon dönemindeki araşidonik asidin siklooksijenaz ürünleri olan lökotrien, lipid peroksitlerin oluşumu vazokonstriktör etkiye sahip olan bu maddeler aracılığı ile hipoperfüzyona yol açar (98).

Araşidonik asidin lipooksijenaz metabolitleri olan lökotrienler ödem gelişmesinde etkilidir. Haris, Black, Hoff lökotrienlerin iskemide ödemi arttırdığını göstermişlerdir (99).

Aynı uzunluktaki inkomplet bir iskemi komplet iskemiye oranla daha ağır seyreder. Meyers bunun nedeninin oksijenlenmenin devam etmesine karşın enerjiden yoksun kalan dokudaki serbest radikal hasarına ve dokunun glukozlanması nedeniyle ortaya çıkan asidozise bağlamıştır. Nishigaya (1991) resirkülasyonun etkilerini incelemiş ve iskemi sonrası oksijen şoku sonucu mitokondrial solunum zincirinin çalışmaması nedeniyle serbest radikallerin oluşarak ödemi arttırdıklarını göstermiştir (100).

#### **2.7. Deneysel Serebral İskemi Modelleri**

Serebral iskeminin klinik pratikteki önemi, çeşitli biçimlerde deneysel iskemi modellerinin geliştirilmesine yol açmıştır (101,102). Deneysel iskemi

çalışmalarındaki amaç, insandaki iskemik inme sendromuna benzer bir modelin geliştirilmesidir. Böylesi bir modelin taşınması gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1. Oluşacak olan infarktın yerleşimi ile boyutlarının önceden tahmin edilebilmesi.
2. Infarkt gelişme olasılığının yüksek olması,
3. Modelin oluşturulması sırasında beyine olan müdahalenin en aza indirilmesi,
4. Beyin üzerinde herhangi bir cerrahi işlemin olmaması ya da nöral atmosfer ile temasından kaçınılması (103),
5. Söz konusu modelin farklı hayvan türlerinde de uygulanabilmesi (104,105),
6. Anestezi verilmemiş deneklere de uygulanabilirliği (106,107),
7. İn vivo perfüzyon ve fiksasyon mümkün olabilmesi (108),
8. Modelin standart ve tekrarlanabilen özellikte olması.

Belirtilen bu amaçlara uygun biçimde yapılmış olan çalışmalar, literatürde herhangi bir iskemi modelinin değişik modifikasyonlarını karşımıza çıkarmaktadır.

Fizyolojik kontrollü ve standart in vivo hayvan modellerinin geliştirilmesi serebral iskeminin fizyopatolojisi ile tedavisi konusundaki sistemik çalışmaların yürütülebilmesi açısından bir zorunluluktur (109). Bunun nedenleri:

- a) İnsandaki iskemik inme sendromunun, ortaya koyduğu bulgular ve anatomik lokalizasyonları itibarıyla bir takım değişkenlikler gösterebilmesi,
- b) Histopatolojik, biyokimyasal ve fizyolojik incelemelerin sıklıkla invaziv cerrahi girişimleri ve beyin dokusuna direkt bir müdahaleyi gerektirmesi,
- c) İskemik olayların oldukça erken devresinde ortaya çıkan bulguların sadece laboratuvar hayvanlarında incelenebilmesi,
- d) İskeminin temelinde yatan anormal perfüzyon olayının incelenebilmesi için gerekli vasküler yapının, doku kesitleri yada nöronal-glial hücre kültürleri gibi modellerden elde edilmesinin olanaksızlığı,

Sıçan gibi küçük laboratuvar hayvanlarında nörolojik defisitlerin değerlendirilmesindeki güçlükler ve insan iskemik inme sendromunda sık olarak

görülmeyen solunum değişiklikleri ile konvülsiyonların ortaya çıkabilmesi bir dezavantaj oluşturabilir. Bununla birlikte, düşük maliyete sahip olması, hayvan ağırlığıyla orantılı olarak maliyeti artan histopatolojik incelemelerde sağladığı avantaj, türler arasında nispeten homojeniteye sahip olması, in vivo fiksasyon prosedürlerine iyi uyum sağlayan küçük beyin hacmi, insanlara oldukça yakın serebrovasküler anatomi ile fizyolojiye sahip olması gibi birçok avantajları nedeniyle sıçanlar deneysel iskemi modellerinin oluşturulmasında oldukça yaygın kullanım alanı bulmuştur (102,110).

### **2.7.1.Sıçanlarda Fokal Serebral İskemi Modelleri**

Sıçanlarda serebral iskemi reperfüzyona açık ya da kapalı bir biçimde geliştirilebilir ve lokalize pannekroz veya infarkt ile sonuçlanır Fokal serebral iskemi modelleri şunlardır (111):

- a- MCA oklüzyonu ve varyantları
- b- Spontan hipertansif sıçanda inme modeli
- c-Fotokimyasal fokal serebral tromboz
- d-Çeşitli serebral emboli ve tromboz modelleri
  - Kan pıhtısı ile embolizasyon
  - Mikrosfer embolizasyonu
  - Fotokimyasal yolla başlatılan tromboemboli
  - Araknoidat ile oluşturulan tromboz

En yaygın olarak kullanılan yöntem tek bir serebral damarın oklüzyonu ile fokal iskemi oluşturulmasıdır. Seçilen damar ise çoğunlukla MCA olmaktadır (64).

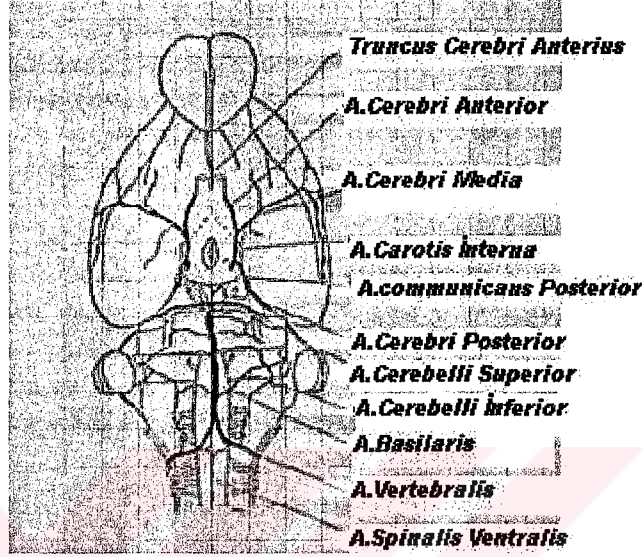
İdeal olan durum, infarkt modelinin intakt bir kraniumda geliştirilmesi suretiyle intrakranial basınç değişiklikleriyle ödem ve serebral kan akımının olması gereken patolojik değerler dışına çekilmemesidir (105,109,112).

### **2.7.2. Sıçan Serebrovasküler Anatomisi (118,119)**

Sıçan serebral vasküler anatomisi insandakine çok benzer. Her bir serebral hemisferi besleyen anterior, medial ve posterior serebral arterler mevcuttur. Bunlar proksimalden distale doğru olmak üzere bazal perforan dallar



ile kortikal dallar verirler. Sığanlarda bu üç arterin tümü de internal karotid arterlerden orijin alırlar. Ancak bir azigos anterior serebral arter ve sağ-sol posterior kommünikan arterler yoluyla modifiye bir Willis poligonu söz konusudur (Şekil 5).



Şekil 5. Sığanda serebral arteriyel sistemin ventralden görünümü (119)

MCA olfaktor traktüs üzerinden dışarı doğru uzandıktan sonra hemisferin lateral yüzeyini besleyen büyük dallar vermektedir. MCA orijiniyle olfaktor traktüs dış kenarı arasındaki segmentten kaudat-putamen kompleksinin arka bölümünü besleyen medial perforan dallar ile lentikülostriat dallar ayrılır. Olfaktor traktüsü besleyen arter dalları ise oldukça değişkendir, MCA proksimal segmentinden çıkabildiği gibi nadiren internal karotid arterden de çıkabilir.

Kaudat-putamen kompleksinin ön dış bölümü MCA'nın lateral striat dalları tarafından beslenirken medial bölüm ise anterior serebral arterden gelen Heubner arterinden kaynaklanmaktadır (120).

Olfaktor traktüs lateral kenarı boyunca uzanan rhinal fissürde rhinal ven seyretmekte olup, MCA'dan önce ve arkaya doğru ayrılan birer rhinal arter bu vene eşlik eder.

MCA'nın olfaktor traktüs distalindeki segmenti ise oldukça değişken kortikal dalları verir. Bunların başlıcaları piriform ve temporal arter dalları ile MCA bifurkasyonu ile ortaya çıkan frontal ve parietal arter dallarıdır.

MCA bifurkasyonu genellikle hemisfer lateral yüzünde ön arka doğrultuda seyreden ve inferior serebral ven adını alan vasküler yapının üzerinde yer alır.

## **2.8. İskemik İnmede Nöroprotektif Tedavi**

Fokal beyin hasarını engellemek için uygulanan nöroprotektif tedavi; iskemi sonucu gelişen hücresel, biyokimyasal ve metabolik hasarı engellemeye yöneliktir (121).

Nöroprotektif tedavinin esas amacı yetersiz kan akımı sırasında oluşan doku hasarını minimuma indirmektir. Nöronal iskemiye takiben ortama salınan glutamat, NMDA, AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-propionat) ve kainat reseptörleri üzerinden etki ederek hücre içerisine kalsiyum ve sodyum girişine yol açmakta ve nöronal hücre hasarına katkıda bulunmaktadır. Laktik asit birikimi, zink, serbest radikaller, NMDA reseptörlerinde defosforilasyon, NMDA reseptör aktivitesinin kalsiyum-kalmodulin aktivitesiyle azaltılarak AMPA ve kainat reseptör aktivitelerinin ön plana çıkması iskemi sonrası görülen olaylardır. Eksitotoksositeye ek olarak apoptoz da nöronal hücre hasarında rol oynamaktadır (122).

MCAO'dan 1-2 saat sonra veya öncesinde NMDA antagonistleri verildiği zaman infarkt hacmini %50 oranında azaltması, muhtemelen depolarizasyona bağlı kalsiyumun hücre içine akımını engellemesiyle olmaktadır. AMPA reseptör blokerleri büyük oranda umut vericidir. En son bazı modellerde , birkaç kalsiyum antagonisti benzer iyileştirici etkiyi oluşturmuştur. Bunun yolu da perfüzyonu sağlanabilen penumbranın, kan akımının düzeltilmesiyle olasıdır (47).

Dimetiltiyöüre ve allopurinol gibi serbest radikal taşıyıcılar, kalıcı MCAO'nu takiben infarkt çapını azaltır ve muhtemelen reperfüzyonla hareket halindeki reaksiyon takımının bazılarını engeller. Şekillenen serbest radikaller için olası bir taşıyıcı endotelial hücrelerdir, uzun iskemik periyodu boyunca serbest radikallere bağlı doku hasarı, reperfüzyon sonrasında oluşabilmektedir. Kanıtlar PAF (Platelet Aktive edici Faktör)'ün, lökosit ve plateletlerin inflamatuvar reaksiyonlarda oynadığı role benzer bir işlevi olduğu yönündedir, böylelikle mikrosirkülasyonun tehlike altına girmesine yol açmaktadır. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz metabolitleri, geçici önbeyin iskemisinde vasküler ve sellüler

değişikliklere zorluyor fakat bu yolların blokerlerinin bölgesel iskemide önemli olup olmadığına dair yeteri kadar veri yoktur.

Akut iskemik inmede denenmiş veya denenmekte olan diğer nöroprotektif ajanlar: Glutamat antagonistleri, kalsiyum kanal antagonistleri, sodyum kanal antagonistleri, glisin antagonistleri, serbest radikal gidericiler ve antagonistleri, gangliozidler, membran stabilize edici ajanlar, anti-inflamatuar ajanlar, magnezyum sülfat, opioid antagonistleri, GABA agonistleri, potasyum kanal modülatörleri ve Epo'dir (122).

## **2.9. Eritropoietin (Epoetin)**

Bir glikoprotein hormon olan (molekül ağırlığı 36 kilodalton ) bu maddenin erişkinlerde %90'ı böbrekte ve % 10'u karaciğerde üretilir. Gelişmekte olan fötusta ise esas olarak karaciğerde yapılır. Kemik iliğinde projenitör hücrelerin fonksiyonel eritroblastlara farklılaşmasını stimüle eder. Kronik böbrek yetmezliği, böbrek eritropoetin üretimini azaltarak böbrek hastalığı anemisine neden olur. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen Epo pazarlanmıştır; ilaç olarak jenerik adı epoetin'dir.

Epo'in eliminasyonu yavaştır (ortalama yarılanma ömrü 4.5-11 saat) Oral alımı yoktur (123).

Epoetin (rekombinant insan eritropoetini) alfa ve epoetin betanın klinik etkililiği benzerdir. Epoetin beta ayrıca düşük doğum ağırlıklı preterm bebeklerde aneminin önüne geçilmesi amacıyla kullanılır (124).

Epo sinir sisteminde varlığı ve nöroprotektif etkisi son yıllarda gösterilmiş olan hematopoetik bir sitokin hormondur (125).

Epo ve reseptörü hem merkezi, hem de periferik sinir sisteminde bulunmakta ve hipoksi gibi uyanlarla ekspresyonları artmaktadır (125,126,127).

Değişik in vitro çalışmalarda (128,129) değişik nöron gruplarında nörotrofik etkisi ve çeşitli hasar modellerinde in vitro koruyucu etkisi gösterilmiş olan Epo'in, in vivo inme nöroinflamasyon, beyin travması, subaraknoid kanama, deneysel epilepsi ve parkinsonizm gibi deneysel modellerde de nöronları koruyucu etkisi belirlenmiştir (130-135).

Epo'in nöroprotektif etkisinin mekanizmaları kesin belli değildir. Hücre canlılığını artırıcı sinyalleri modüle edici, (126,135,136,137) anti-apoptotik (135,138), anti-oksidan (135), anti-inflamatuvar (135) ve kalsiyum (139,140) ve glutamat metabolizmaları (129,138) üzerine modüle edici etkileri nöroprotektif etkisine aracılık ediyor olabilir. SSS'i nöronlarında Epo reseptörlerinin varlığı tanımlanmıştır ve astrositlerin Epo ürettiği tespit edilmiştir. Epo, kültürü yapılmış nöronlarda, N-Metil-D-Aspartat ve glutamat toksisitesinden koruduğu gözlemlenmiştir (129). Yapılan araştırmalar in vivo koşullarda Epo'in nöronları iskemi kaynaklı hücre ölümünden koruduğu saptanmıştır (129). Nöron kültürlerinde, mevcut Epo, hücre içi artan  $Ca^{++}$  konsantrasyonunu baskılayarak nitrik oksit (NO) kaynaklı hücre ölümünden kurtarır (141). Epo bu koruyucu etkisini, serbest radikalleri azaltarak ya da diğer toksisiteyi antagonize ederek ortaya çıkarabilir (142).

Epo özellikle perinatal asfiksini muhtemel tedavisi yanında , yetişkin ve çocuklarda MSS'deki çeşitli düzensizliklerin tedavisinde yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. Epo;

- 1-Glutamat toksisitesini azaltmak
- 2-Nöronal antiapoptotik faktörün üretimini tetiklemek
- 3-Inflamasyonu azaltmak
- 4-Nitrik Oksitten kaynaklanan yaralanmaları azaltmak
- 5-Direk antioksidan etkileri nedeniyle muhtemelen gelişmekte olan ve hasarlı beyinlerde nörotrofik ve nöroprotektif etki gösterir (127).

### 3. MATERYAL VE METOD

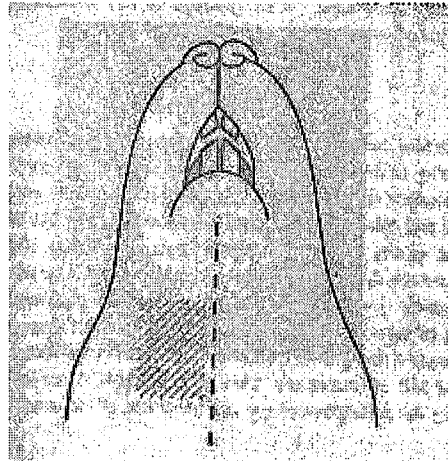
#### 3.1. Deney Sıçanlarının Hazırlanması:

Bu çalışma için Dicle Üniversitesi Deneysel Çalışma Etik Kurulundan 11.12.2003 ve B.30.2.DİC.0.00.70.02/224 no'lu sayı ile onay alındı. Çalışmada ağırlıkları 300-350 gram arasında değişen her iki cinsten Sprague-Dawley ırkı deney sıçanları kullanıldı.

Deney sıçanları kontrol grubu ve ilaç grubu olarak iki gruba ayrıldı. Çalışmaya nörolojik ve sistemik yönden normal ve sağlıklı olan hayvanlar alındı. Prosedür öncesinde hayvanların su ve diyetinde kısıtlamaya gidilmedi. Cerrahi girişim öncesinde anestezi olarak ketamine hidroklorid intraperitoneal yoldan 90 mg/kg dozunda uygulandı, yeterli anestezi sağlanamayan sıçanlara ek doz verildi. Ayrıca bronşial sekresyonu azaltmak amacıyla atropin sülfat 40 mikrogram dozunda serum fizyolojik içinde sulandırılarak intramuskuler yoldan verildi (138). Sağ femoral ven 24 numara anjiocut ile kanüle edildi.

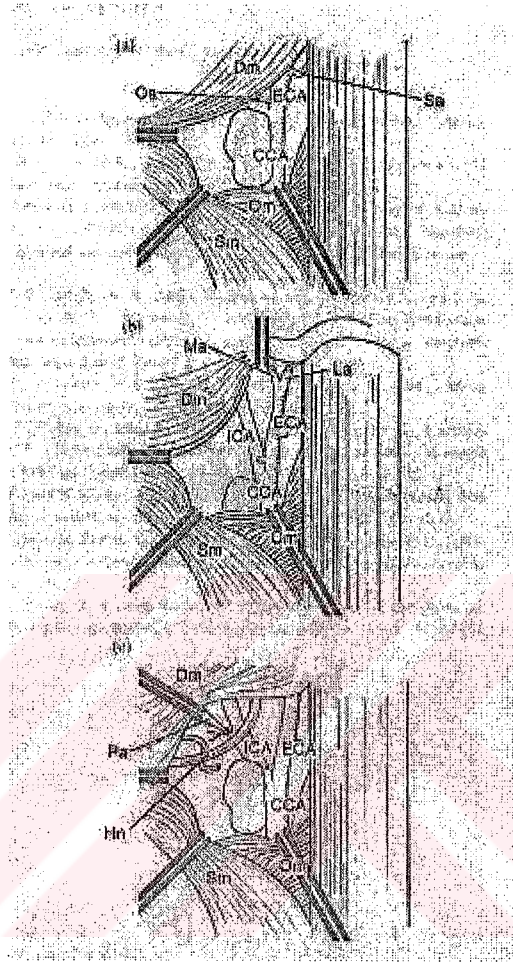
#### 3.1.1. Cerrahi Girişim

Tüm denekler için sağ yarıdan girişimde bulunuldu. Sağ MCA Zea Longa ve arkadaşlarının tanımladığı intraluminal filament metodu kullanılarak 2 saatliğine oklüde edildi (139,140). Yeterli anestezi sağlanmış olan hayvanda, sağ boyun bölgesi traş edildikten sonra sırtüstü pozisyon verilerek tesbit edildi (Şekil 6)(141).



**Şekil 6.** Servikal deri insizyon başlangıcı ve cerrahi alan lokalizasyonu

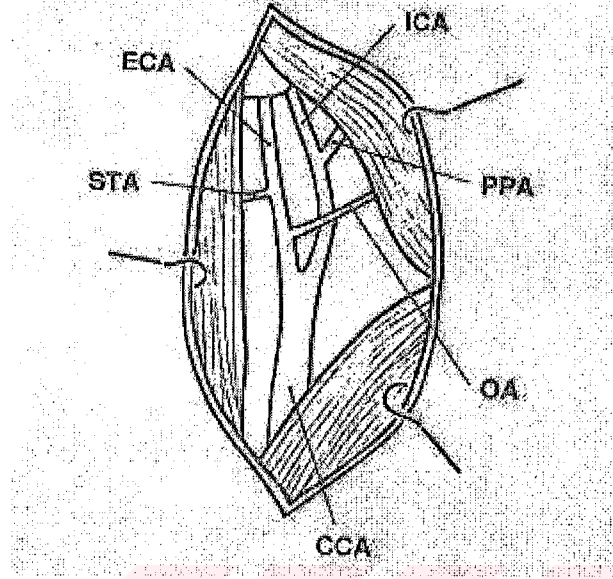
Kısaca, mikroskop altında, sağ a.Karotis Kommunis orta boyun eksizyonu ile ortaya çıkarıldı.(Şekil 7) (141)



**Şekil 7. Sağ karotid arterin şematik yapısı:** ECA: Eksternal Karotid Arter, CCA: Kommon Karotid Arter, ICA: İnternal Karotid Arter, Dm: Digastrik Kas, Oa: Oksipital Arter, Sa: Superior Tiroid Arter, Om: Omohyoid Kas, Sm: Sternomastoid Kas, Pa: Pterigopalatin Arter, Hn:Hipoglossal Sinir, Ma: Maksiller Arter, La:Lingual Arter

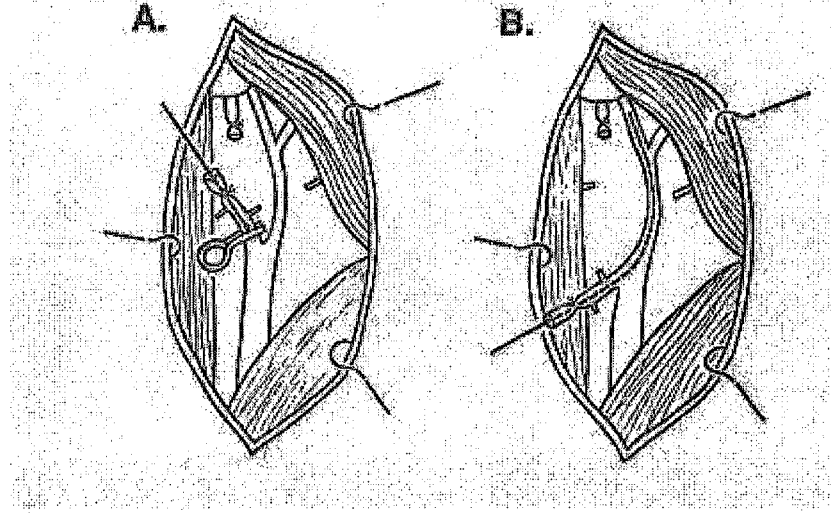
Eksternal karotid arter (ECA) ile internal karotid arter (ICA) ortaya çıkarıldı, ilk olarak eksternal karotid arterden çıkan oksipital dal bipolar koter yardımıyla koterize edilip kanlanması iptal edildi. Sonra sırasıyla eksternal karotid arterden çıkan, süperior tiroidal arter bipolar koter ile terminal lingual ve maksiller arterler ise 5/0 ipek ile bağlanarak iptal edildi ve böylece ECA serbestleştirilmiş oldu. ICA ortaya çıkarılıp mikrodiseksiyonla komşuluğunda

seyreden vagal sinir izole edildi. ICA'in kranium dışından ayrılan dalı, pterigopalatinal arter, çevresindeki yumuşak dokulardan sıyrıldıktan sonra 5/0 ipek ile bağlanıp iptal edildi (Şekil 8) (141).

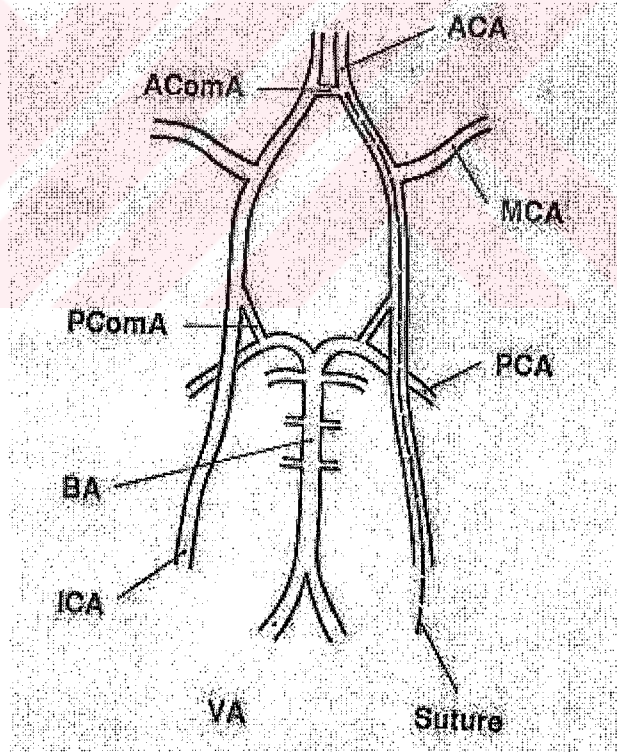


**Şekil 8.** Boyunda arteryel anatomi şeması. Boyun derisi insizyonundan sonra, sol kommon karotid arter (CCA) ve eksternal karotid arter (ECA), internal karotid arter (ICA) ve onların dalları ortaya çıkmıştır. PPA: Pterigopalatin arter, OA: oksipital arter, STA: superior tiroid arter.

ECA'in hemen karotid arter bifurkasyonundan ayrıldığı yerden, etrafına 4/0 ipek gevşek olarak bağlandı. 4 cm'lik 3/0 monoflaman naylon sütür proksimal ECA'dan geçirilerek ICA'e girildi. Oradan hayvanın ağırlığına göre değişmekle birlikte ICA bifurkasyonundan itibaren MCA'ya 19-20 mm ilerletildi (Şekil 9,10) (141). 3/0 monoflaman naylon kullanılmadan önce poly-L-lysine solüsyonundan geçirildi, ucu ısı ile küntleştirildi ve 60 derece ısıda bir saat boyunca ısıtılıp yumuşatıldı. Poly-L-Lysine ile kaplama prosedürünün infarkt ve iskemi hacmini arttırdığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (138,140,142). MCAO'dan 2 saat sonra sıçanların intraluminal sütürü dikkatlice geri çekildi, ECA'dan kanamayı engellemek için 4/0 ipek ile bağlandı ve bipolar ile koterize edildi (138-140,142). Takiben boyun insizyonu ipek keskin sütür ile kapatıldı. İşlem sırasında ölen sıçanlar çalışma dışı bırakıldı.



**Şekil 9.** :Naylon sütün kesilmiş eksternal karotid arterden(ECA) internal karotid artere geçirilmesi işleminin şematik gösterilmesi



**Şekil 10.** İskemi süresince naylon sütün pozisyonunun şematik görünümü. MCA'nın başlangıcı suture tarafından oklude ediliyor. ACA: Anterior serebral arter. PCA: Posterior serebral arter, ACom A: Anterior



kommunikan arter, PComA: Posterior kommunikan arter, BA: Basiller arter, ICA: Internal karotid arter, VA: Vertebral arter.

### 3.2. Klinik Takip

Her iki gruptaki hayvanlar MCAO'dan önce , MCAO'dan sonra 24, 48 ve 72. saatlerde 3 gün boyunca takip edildi ve günlük olarak değerlendirildi.

Klinik değerlendirmede, birincisi Bederson ve arkadaşlarının geliştirdiği hayvanların kuyruklarından asılırken üst vücut postürünün muayenesine dayanan postural refleks testi, ikincisi; De Ruck ve arkadaşlarının geliştirdiği, görme, dokunma, proprioseptif uyarılarına verilen yanıtın ön ekstremitte asma testi ile bütünleştirilip sensorimotor muayenesine dayanan ön ekstremitte asma testidir. Nörolojik fonksiyonlar 0-12 puan arasındaki skalada derecelendirildi. Hayvanlar standart nörodavranışsal testler kullanılarak değerlendirildi (138-140,142,143).

**TABLO 4. MCAO'lu Sığırcıların Nörolojik Değerlendirme Skorları:**

	<b>Normal Skor</b>	<b>Defisit</b>
<b>Postural Refleks (sallama testi)</b>	0	2
<b>Yer testi (her yan için yapılır)</b>		
Gözle izlem -		
Öne doğru yürüme -	0	2
Yana doğru yürüme	0	2
<b>Dokunma Testi</b>		
- Hayvan ayağının dorsal yüzü	0	2
Hayvan ayağının lateral yüzü	0	2
<b>Proprioseptif test</b>	0	2
<b>Toplam Skor</b>	0	12

### 3.3.Deneysel Gruplar

Hayvanlar iki gruba ayrıldı:

1. **Grup (Kontrol Grubu):** 15 sıçana izotonik solüsyon 5 cc/kg, MCAO'dan 2 saat sonra femoral venden 3 dakikada gidecek şekilde verildi.

2. **Grup (İlaç Grubu):** 15 sıçana 5000 ünite/kg Eritropoietin (recombinant-Human-Erithropoietin (r-Hu-Epo) ), MCAO'dan 2 saat sonra intraperitoneal olarak uygulandı. (Neorecormen® 5000 İÜ hazır enjektör formu)

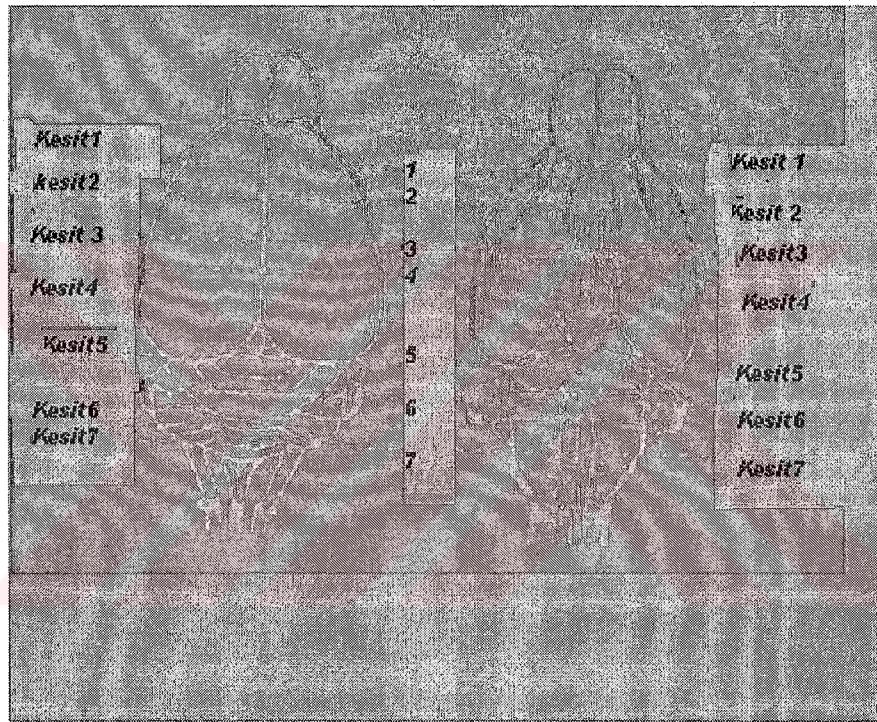
### 3.4. İnfarktın Değerlendirilmesi

#### 3.4.1. Anatomopatolojik inceleme

Hayvanlar tedaviden 3 gün sonra sakrifiye edildi. Beyinler, %40'lık formaldehit, glacial asetik asid, metanol (1:1:8 oranında) karışımı ile perfüze fikse edildi (138,140,142). Yüzeysel infarkt alanı makroskopik ölçümü için dorsalden ve sağ lateralden beyin fotoğrafları çekilip bilgisayar ortamına aktarıldı. Soğutulmuş beyinlerden optik kiazma seviyesinde 2 mm kalınlığında koronal kesitler alındı. Kesit yerlerinin saptanmasında sıçan nöroanatomi atlasında gösterilen Craigie (1925) tarafından yapılmış olan çizimler ile De Groot (1959) tarafından tanımlanmış olan koordinatlardan yararlanıldı (140) (Şekil 11). Kesitler 37 derecede, karanlıkta 30 dakika % 1'lik 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC) boyası içinde bekletildi. % 1'lik TTC boyası, pH 7.4 olan fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. TTC boyası, infarkt alanlarında tutulmayıp soluk ve beyaz olarak görülürken normal perfüze olan kortikal ve derin beyin yapıları ise TTC ile kırmızı renge boyandı. Bu prensiplere göre serebrumdan 5, serebellum ve beyin sapından ise 3 kesit oluşturuldu.

Önce kesitlerin makroskopik fotoğrafları çekildi. Koronal kesit lezyonlarının, tüm beyine olan oranının saptanmasında gerek kortikal, gerekse derin yerleşimli lezyonların maksimum yer kapladığı 3 no'lu kesitler kullanıldı. Yüzeysel ve koronal kesit infarkt alanlarının makroskopik değerlendirilmesinde bilgisayar ortamına aktarılan görüntülerin üzerine milimetrik ölçümlü transparan kağıt konularak hesaplama yapıldı.

Hazırlanan kesitler formaldehit içine konulup tespit edildi. Daha sonra kesitler parafin bloklar haline getirilip rostral yüzlerinden 3 mikron kalınlığında histolojik kesitler elde edildi. Bunlar Hematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelemeye alındı. İnfarkt kriteri olarak, mikrovakülleşme, astrositer reaksiyon, glial reaksiyon, ödem ve dokuda çözülme gibi genel bilgiler bölümünde sözü edilen özellikler esas alındı. Lezyonların sınıflandırılmasında hafiften-ağır'a doğru artan dereceli sistem (Evre 1, 2, 3, 4) kullanıldı.(77-79)



Şekil 11. Koronal beyin kesitlerinin elde edilmesinde kullanılan referans noktaları.

### 3.5. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi nörolojik skor, yüzeysel lezyon oranı, koronal kesit alanlarında lezyon oranı; histopatolojik inceleme sonuçları derecelendirilerek bağımsız kümeler üzerinde basit klinik deneylerde kullanılan ortalama, standart sapma, varyasyon katsayısı istatistiksel parametreleri hesaplanarak yapıldı.

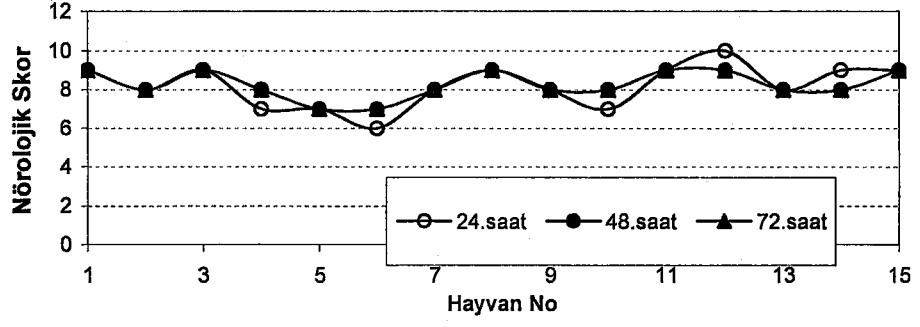
## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Nörodavranışsal Değerlendirmeler

MCAO'dan önce Epo (r-Hu-Epo) verilen çalışma grubu ile kontrol grubu nörolojik olarak sağlıklı bulundu (Skor: 0)( Tablo 4). İzotonik ile tedavi edilen kontrol grubunda, 3 günlük yaşam periyodu boyunca ciddi davranışsal bozuklukların devam ettiği ve 24, 48, 72. saatlerde aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Tablo 5). 2 saatlik MCAO'dan hemen sonra Epo verilen sıçanlar arasında, izlem süresi boyunca davranışsal açıdan 24, 48 ve 72. saatlerde giderek azalan nörolojik skor saptandı (Tablo 6). Epo verilen sıçan grubu, kontrol grubuna kıyasla günlük takiplerinde nörolojik skor olarak Şekil 14 ve 15'de görüldüğü gibi yaklaşık % 25 oranında daha iyi bulundu.

**Tablo 5.** Kontrol (İzotonik) grubunda zamana bağlı total nörolojik skorlar.

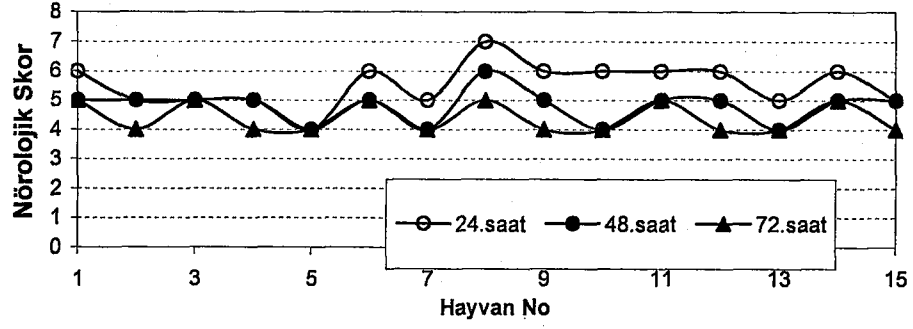
Hayvan No	24.saat	48.saat	72.saat	Birim Ortalaması
1	9	9	9	9
2	8	8	8	8
3	9	9	9	9
4	7	8	8	8
5	7	7	7	7
6	6	7	7	7
7	8	8	8	8
8	9	9	9	9
9	8	8	8	8
10	7	8	8	8
11	9	9	9	9
12	10	9	9	9
13	8	8	8	8
14	9	8	8	8
15	9	9	9	9
Grup Ortalaması	8	8	8	8



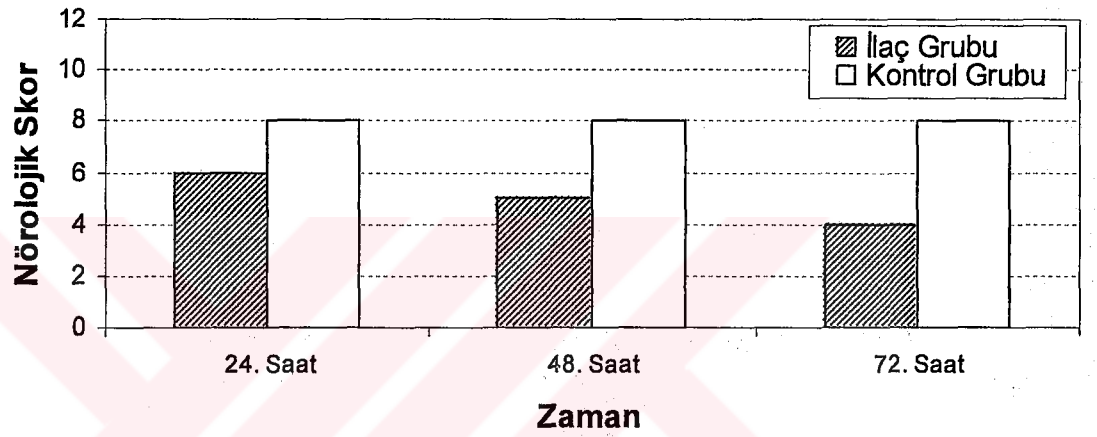
**Şekil 12.** Kontrol (İzotonik) grubunda saatlere göre nörodavranışsal test sonuçları

**Tablo 6.** İlaç (Epo) grubunda zamana göre total nörolojik skorlar.

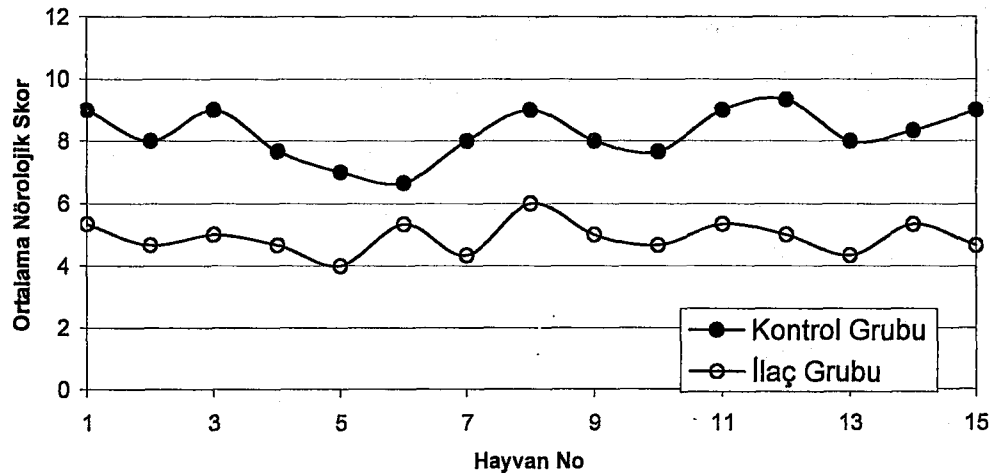
Hayvan No	24.saat	48.saat	72.saat	Birim Ortalaması
1	6	5	5	5
2	5	5	4	5
3	5	5	5	5
4	5	5	4	5
5	4	4	4	4
6	6	5	5	5
7	5	4	4	4
8	7	6	5	6
9	6	5	4	5
10	6	4	4	5
11	6	5	5	5
12	6	5	4	5
13	5	4	4	4
14	6	5	5	5
15	5	5	4	5
Grup Ortalaması	6	5	4	5



Şekil 13. İlaç Grubunda Nörolojik skorun saatlere göre değişimi



Şekil 14. Kontrol ve ilaç grubunda total nörolojik skorların saatlere göre karşılaştırılması

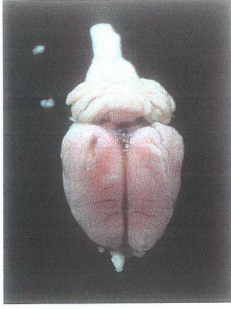


Şekil 15. İlaç (Epo) ve Kontrol (İzotonik) Grubu Nörolojik Skor ortalamalarının karşılaştırılması

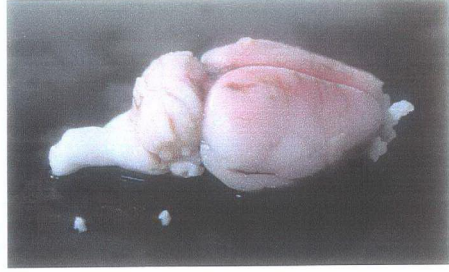
#### 4.2. Lezyon Alanlarının Değerlendirilmesi

MCAO oluşturulup izotonik verilen kontrol grubu sıçanların beyinlerinde yüzeyel lezyon alanının, toplam yüzeyel beyin alanına (Şekil 16 a,b) oranı ortalaması % 26.1 oranında bulunmuştur (Tablo 7). Oysa MCAO oluşturulup Epo verilen ilaç grubu sıçanların beyinlerinde yüzeyel lezyon alanının, toplam yüzeyel beyin alanına (Şekil 16 c,d) oranı ortalaması % 14.4 olarak saptandı (Tablo 8). Böylece Epo verilen ilaç grubunda yüzeyel lezyon alanında, izotonik verilen kontrol grubuna göre yaklaşık % 45 oranında düzelme sağlandı (Şekil 19). MCAO oluşturulup izotonik verilen kontrol grubu sıçanların beyin koronal kesit lezyon alanının, tüm koronal kesit alanına (Şekil17) oranı ortalaması % 11.6 olarak saptandı (Tablo 9). Oysa MCAO oluşturulup Epo verilen ilaç grubu sıçanların beyinlerinde koronal kesit lezyon alanının, tüm koronal kesit alanına (Şekil 18) oranı ortalaması % 5.7 olarak saptandı (Tablo 10). Böylece Epo verilen ilaç grubunda koronal kesit lezyon alanında, izotonik verilen kontrol grubuna göre yaklaşık %51 oranında düzelme sağlandı (Şekil 20).

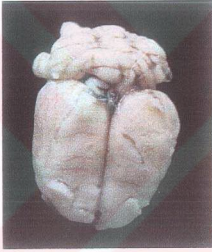
Yapılan histopatolojik incelemede kontrol grubunda evre 2-3 iskemik nöronal değişiklikler yoğun olarak görülürken, Epo grubunda evre 1-2 iskemik nöronal değişiklikler yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 21,22, Tablo 11).



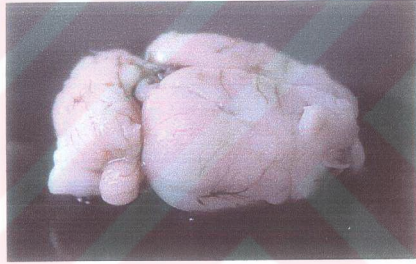
a



b



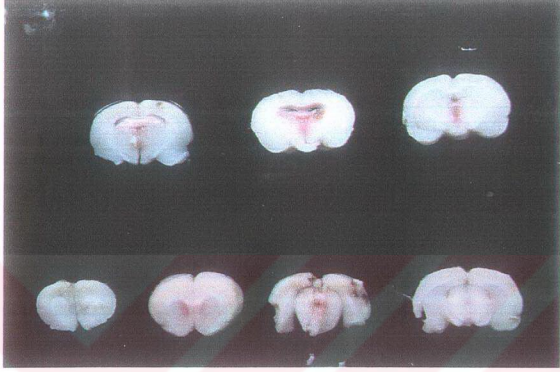
c



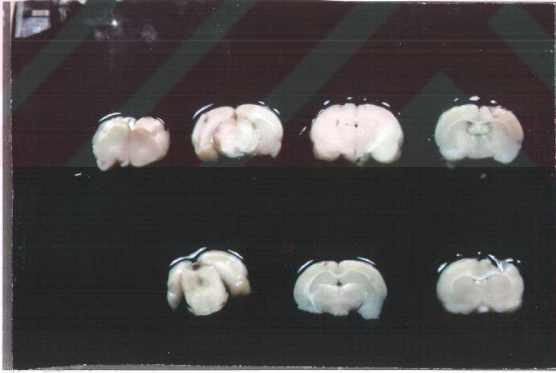
d

**Şekil16 .** a) Kontrol (izotonik) grubunun yüzeyel lezyonun dorsal görünümü. b) Kontrol (izotonik) grubu yüzeyel lezyonun sağ lateralden görünümü. c) İlaç (Eritropoietin) grubunda yüzeyel lezyonun dorsal görünümü. d) İlaç (Eritropoietin) grubunda yüzeyel beyin lezyonunun sağ lateralden görünümü





Şekil17. Kontrol (İzotonik) grubunda koronal kesitlerdeki görünüm



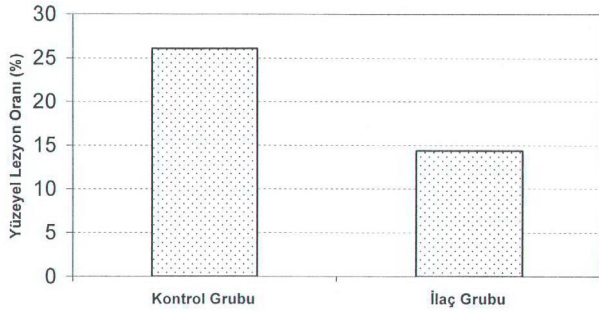
Şekil18. İlaç (Eritropoietin) grubunda koronal kesit görünümü.

**Tablo 7.** Kontrol (İzotonik) Grubunda beyin yüzeyindeki lezyonların alanları, toplam alan ve yüzde oranı

Hayvan No	Toplam Yüzey Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Yüzey Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Oranı (%)
1	160	42	26.3
2	162	50	30.8
3	156	35	22.4
4	154	28	18.2
5	165	45	27.3
6	160	50	31.3
7	153	34	22.2
8	166	55	33.1
9	156	32	20.5
10	155	34	21.9
11	165	48	29.1
12	158	38	24.1
13	155	36	23.2
14	163	50	30.7
15	161	48	29.8
<i>Ortalama</i>	<i>159.3</i>	<i>41.7</i>	<i>26.1</i>

**Tablo 8.** İlaç (Epo) Grubunda beyin yüzeyindeki lezyonların alanları, toplam alan ve yüzde oranı

Hayvan No	Toplam Yüzey Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Yüzey Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Oranı (%)
1	154	21	13.6
2	162	23	14.2
3	149	26	17.4
4	156	25	16.0
5	160	22	13.8
6	157	25	15.9
7	153	15	9.8
8	160	23	14.4
9	154	18	11.7
10	152	21	13.8
11	161	30	18.6
12	156	19	12.2
13	155	23	14.8
14	158	22	13.9
15	166	27	16.3
<i>Ortalama</i>	<i>156.9</i>	<i>22.7</i>	<i>14.4</i>



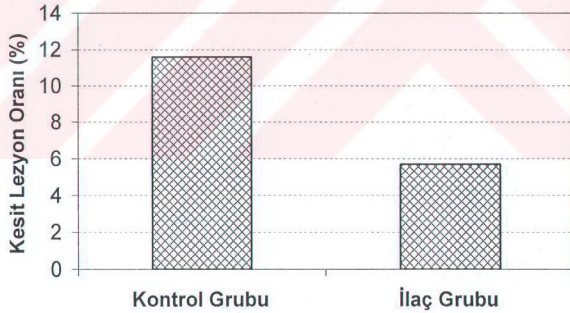
Şekil 19. Kontrol ve ilaç grubunda yüzeysel alanların karşılaştırılması

Tablo 9. Kontrol (İzotonik) grubunda koronal beyin kesitlerinde lezyon alanı, toplam alan ve yüzde oranı.

Hayvan No	Toplam Alanı (mm <sup>2</sup> )	Kesit Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Kesit Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Oranı (%)
1	114	13	13	11.4
2	110	11	11	10.0
3	123	22	22	17.9
4	115	11	11	9.6
5	112	16	16	14.3
6	120	15	15	12.5
7	124	18	18	14.5
8	113	12	12	10.6
9	116	11	11	9.5
10	118	15	15	12.7
11	122	13	13	10.6
12	115	8	8	6.9
13	109	13	13	11.9
14	120	10	10	8.3
15	118	15	15	12.7
<b>Ortalama</b>	<b>116.6</b>	<b>13.5</b>	<b>13.5</b>	<b>11.6</b>

**Tablo 10.** İlaç (Epo) grubunda koronal beyin kesitlerinde lezyon alanı, toplam alan ve yüzde oranı

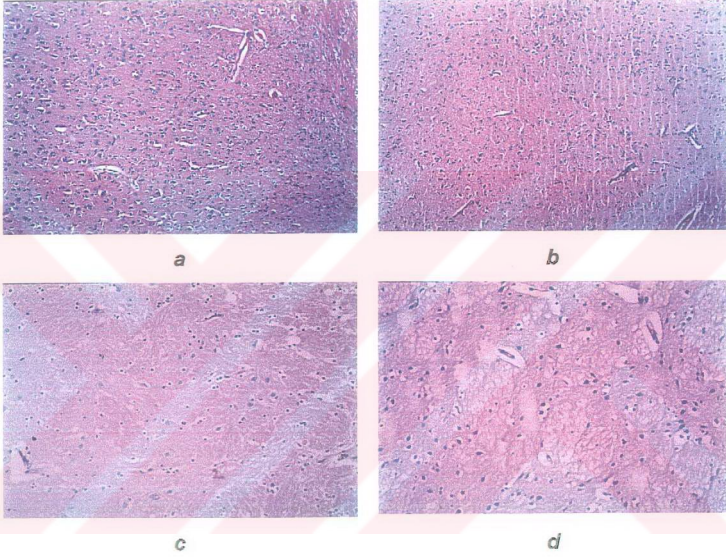
Hayvan No	Toplam Kesit Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Kesit Alanı (mm <sup>2</sup> )	Lezyon Oranı (%)
1	117	7	5.9
2	109	9	8.3
3	115	6	5.2
4	113	7	6.2
5	107	5	4.7
6	120	11	9.2
7	125	8	6.4
8	116	5	4.3
9	109	6	5.5
10	121	6	4.9
11	112	5	4.5
12	126	6	4.8
13	111	7	6.3
14	118	5	4.2
15	109	6	5.5
<b>Ortalama</b>	<b>115.2</b>	<b>6.6</b>	<b>5.7</b>



**Şekil 20.** Kontrol ve ilaç grubunda koronal kesit lezyon oranlarının karşılaştırılması

#### 4.3. Histopatolojik Değerlendirme

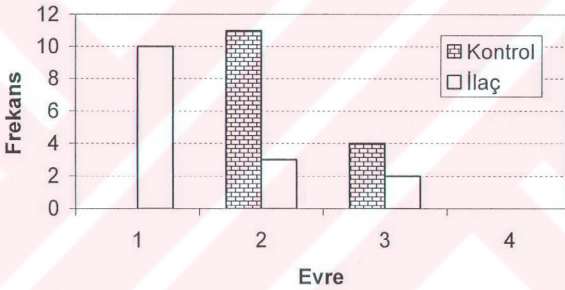
Yapılan histopatolojik incelemede Eritropoietin verilen ilaç grubunda Evre 1-2 iskemik nöronal değişiklikler (şekil 21, b,c) sık olarak izlenirken, kontrol grubunda Evre 2-3 iskemik nöronal değişiklikler(şekil 21 c,d) sık olarak izlendi. Sonuç olarak Eritropoietin verilen ilaç grubunda histopatolojik olarak da belirgin düzelme sağlandı.((Tablo 8, şekil 22)



**şekil 21.** a) Normal bir beyin histopatolojik görüntüsü, b) ilaç grubunda sık olarak görülen **Evre 1** iskemik değişiklikler: Perikaryada vakoullerin görüldüğü mikrovakoulasyon dönemi. c) Kontrol (izotonik) grubunda sık ilaç grubunda nadir görülen **Evre 2** histopatolojik değişiklikler: Hücrenin daralarak nükleusun kenara itilip koyu boyandığı iskemik hücre değişiklikleri dönemi. d) Kontrol (izotonik) grubunda sık, ilaç grubunda nadir olarak görülen **Evre 3** histopatolojik değişiklikler: Hücre gövdesi vresinde boşlukların oluştuğu inkustrasyon ve iskemik hücre değişiklikleri dönemidir.

**Tablo 11.** Kontrol ve ilaç grubunda histopatolojik görünümlerin görülme sıklığı.

Evre	Frekans	
	Kontrol Grubu	İlaç Grubu
1	0	10
2	11	3
3	4	2
4	0	0



**Şekil 22.** Kontrol ve ilaç gruplarında histopatolojik evrelerin görülme sıklığı.

**Tablo12.** Yapılan deneylerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayılarının toplu sonuçları

İstatistiksel Parametre	Nörolojik Skor		LezyonYüzey Oranı		Lezyon Kesit Oranı	
	Kontrol Grubu	İlaç Grubu	Kontrol Grubu	İlaç Grubu	Kontrol Grubu	İlaç Grubu
Ortalama	8	5	26.1	14.4	11.6	5.7
Standart Sapma	0.8	0.5	4.6	2.2	2.7	1.4
Varyasyon Katsayısı	10	10	17.6	15.6	23.5	24.9

## 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlarda intraluminal sutur kullanılarak oluşturulan 2 saatlik geçici MCAO'da oklüzyon süresinin ve Epo'in verilmiş saatinin nörolojik fonksiyonlara ve infarkt alanına olan etkileri değerlendirilerek Epo'in nöroprotektif etkinliği araştırıldı. Epo verilen sıçan grubu, kontrol grubuna kıyasla günlük takiplerinde nörolojik skor olarak yaklaşık % 25 oranında daha iyi bulundu. 2 saatlik geçici MCAO'dan sonra verilen Epo'in infarkt alanını yaklaşık % 50 oranında azalttığı, histopatolojik incelemede iskemik hücre değişikliklerinde izotonik verilen kontrol grubuna göre düzelme olduğu saptandı.

İzotonik ile tedavi edilen kontrol grubunda, 3 günlük yaşam periyodu boyunca ciddi davranışsal bozuklukların devam ettiği; nörolojik fonksiyonda 24, 48 ve 72. saatlerde aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptandı. 2 saatlik MCAO'dan sonra Epo verilen sıçanlar arasında, izlem süresi boyunca davranışsal açıdan 24, 48 ve 72. saatlerde nörolojik fonksiyonlarda giderek artan iyileşme saptandı. Epo verilen sıçan grubunda, kontrol grubuna oranla yüzeysel ve koronal kesit lezyon alanlarında yaklaşık % 50 oranında bir azalma saptandı. Mikroskobik incelemede ise kontrol grubunda görülen vakouler dejenerasyon, nükleusun kenara itilip koyu boyandığı iskemik hücre değişikliklerinde belirgin bir düzelme olduğu saptandı.

Epo makroskobik, histolojik ve nörolojik fonksiyonlarda görülen bu düzelmeleri muhtemelen glutamat toksisitesini azaltarak, nöronal antiapoptotik faktörün üretimini tetikleyerek, inflamasyonu azaltarak, nitrik oksitten kaynaklanan yaralanmaları azaltarak ve direk antioksidan etkileri nedeniyle hasarlı beyinlerde gösterir (122) Epo'in yüksek dozlarının sistemik uygulandığında kan-beyin bariyerini de geçtiği kanıtlanmıştır (126). Bu hipoteze uygun olarak Epo'in sirkülasyon ile kan-bariyerini geçmesi nöron koruyucu etkisine aracılık ettiğini akla getirmektedir.

Yaptığımız çalışmada 2 saatlik geçici MCAO'dan sonra 5000 Ünite Epo intraperitoneal uygulaması sonrası infarkt alanında yaklaşık %50 oranında azalma saptandı. Yapılan çalışmalarda kalıcı MCAO ile birlikte 1 saatlik geçici karotid arter oklüzyonundan 0, 3 ve 6.saat Epo uygulamasında izotonik

uygulanmasına kıyasla Epo'in infarkt hacmini % 50-75 oranında azalttığı saptanmıştı (126,156). Lezyon alanlarında oluşan farkların oklüzyon süresinin ve oklüzyon sonrası Epo uygulanma saatinin farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. İnme, kortikal travma ve otoimmün ensefalitten kaynaklanan iskemik beyin hasarı primer nöron kayıplarından ve inflamatuvar tepkilerden oluşur. Epo her iki işlemi zayıflatır (126,150). Epo deneysel inmeden sonraki nöronlar için açıkça antiapoptotik olmasına rağmen hala Epo reseptörünü (Epo-R) direkt olarak modüle edip etmediği bilinmemektedir. (Glia, mikrogliya ve diğer inflamatuvar hücreleri.) Bu deneylerde, Epo'in (5000 İÜ/kg) astrosit aktivasyonunu, MCAO ile oluşturulan infarkt alanında, lökosit ve mikrogliaların göçünü belirgin olarak azalttığı gösterilmiş. Buna ek olarak, iskemi sonucu üretilen proinflamatuvar sitokinler; tümör nekrozis faktör, interlökin-6 ve monosit kemotaktik protein 1 konsantrasyonu rh-Epo verilmesi sonrası % 50'den fazla oranda azalmıştır. Nöronal seçici toksin trimetiltin'(TMT) e maruz bırakılan nöronal-gliyal ko-kültürler için de benzer sonuçlar bulunmuş. Fakat Epo nöronal homogenatlara maruz bırakılan astrosit kültürleri tarafından üretilen sitokinleri inhibe edememiş veya insan periferik kan mononükleer hücreleri, sıçan glial hücreleri ve beynin lipopolisakkaride yanıtını düzenleyemediği saptanmış. Bu bulgular Epo'in direkt Epo-R yoluyla inflamatuvar hücreleri etkilemesinden çok nöronal ölümü azaltarak iskemi etkili inflamasyonu hafiflettiğini düşündürür (150). MCA ile beslenen frontal korteks bölgesinde izotonik uygulamalı iskemik sıçanlardan elde edilen beyin kesitleri aktive edilmiş glial hücreler bol miktarda toplandı. (GFAP immünoreaktivite tarafından değerlendirildiği gibi.) Bunun tersi olarak Epo tedavisinden sonra reaktif glialar belirgin olarak azaldı. Reaktif glialar hemen nekrotik merkeze komşu sınırlı belirli bir kortikal bölge içinde gözlemlendi (150). Bu mekanizmalarla epo'in lezyon alanında azalma gösterebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda sıçanlarda Epo'in MCAO başlangıcından 2 saat sonra intraperitoneal uygulanması ile penumbra hücresel (histolojik) hasarı önlediği gösterildi. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda Epo'in iskemi ve hipoksi sonucu indüklenen nöronal apoptozisin inhibitörü olduğu kanıtlanmıştır. Bu bulgular kinaz fosforilasyon çalışmasıyla, spesifik inhibitör kullanılarak



yaşam yolunun Epo tarafından aktive olduğu şeklindeki çalışmayla desteklenmiştir (130). Bu antiapoptotik önlemler (kaspaz inhibitörleri, antiapoptotik gen ekspresyonu Bcl 2) in vivo modellerde serebral iskemiden korunur(151-153). Birçok nöronun MCAO başlangıcından 3 saat sonra, çok azında ise 6 saat sonra verilen Epo tarafından tekrar yenilediği saptanmıştır (154). Bu gözlemler sinir hücreleri tarafından apoptozisin aktivasyonunda gözlenen gecikme ile tutarlıdır. Böylece bu modelde pek çok nöronun iskeminin başlangıcından sonra saatlerce canlı kaldığı ve bu zaman süresince sağlanan antiapoptotik tedavi ile kendini yenileyebildiği gösterilmiştir

Glutamat, intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artışına neden olarak glutamat-Ca colmundilin kompleks artışı ile nitrik oksit sentezini aktive eder ve böylelikle nitrik okside bağlı hücre içi glutamat toksisitesine aracılık eder. In vivo şartlarda nitrik oksit sentez inhibitörlerinin intra-serebroventriküler infüzyonu iskemik hipokampal nöronları koruduğu, nöronal nitrik oksit sentezindeki azalmanın beyin iskemisine karşı dayanıklılığı artırdığı gösterilmiştir (144-148). Mevcut çalışmalarla Epo'in de nitrik oksit üretimini azaltarak nöron hasarını önlediği tespit edilmiştir. Epo'in platelet büyüme faktörü gibi, nöronlarda bulunan süperoksit dismutaz, glutation peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (149).

Kaspaz inhibitörleri tarafından apoptozisin bloke edilmesi inflamasyonu ve inflamatuvar sitokinin indüksiyonunu önler ve sıçan modellerinde serebral iskemiden koruyucu etkileri vardır (155). Reperfüzyon hipereksitabilitesi azaltılabilir. Çünkü Epo'in nöronal eksitabiliteyi direkt olarak etkilediği görülmüştür. Benzer şekilde Epo nöronal nekrozisi de sınırlar (130) Sonuç olarak veriler Epo'in oksijen, nutrisyon, growth faktör eksikliği tarafından tetiklenen nöronal apoptozisi önlediği gösterilmiştir. Bu da Epo'in aynı zamanda hormonu sirküle edici olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Böylelikle sistemik ve lokal sistemler arasında meydana gelen geçiş için bir potansiyel mevcuttur(130).

İnsanlarda hedeflenen klinik olgular kalıcı infarkt alanlarından çok, geçici ve kurtarılabilir iskemik alanlardır Oklüde MCA'in reperfüzyonuna izin

vermesi nedeniyle intraluminal suture kullanılarak MCAO ile bölgesel serebral iskemik oluşturma yöntemi bu yönden avantajlı bir yöntem olarak kabul edilebilir. (139). Akut iskemik inmede nöronal harabiyet, iskemik bölgenin merkezinde dakikalar içinde gelişir. Nöroprotektif tedavi ile iskemik çekirdeğin genişlemesi önlenerek, iskemik penumbranın kurtarılması amaçlanmaktadır. Penumbra bölgesinin erken reperfüzyonu ile oksijen, glukoz ve nöroprotektif ajanların iskemik dokuya ulaşması ve böylece reperfüzyona bağlı hasarın önlenerek penumbranın kurtarılması söz konusu olabilir(121).

Son yıllarda nöroprotektif ilaçlarla yapılan prelinik çalışmalar hız kazanmış ve oldukça ümit veren sonuçlar elde edilmiştir(116). Ancak deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların aynısının veya benzerinin kolayca insanlarda uygulanamayacağı eleştirileri büyük oranda haklılığını korumaktadır. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada Epo'nin nörolojik fonksiyonları düzeltmesi, makroskobik ve mikroskobik lezyonlarda düzelmeye sağladığı göz önüne alındığında bu tür ve benzeri çalışmalar desteklenir ve artırılırsa insanlarda serebral iskemik olaylarda bu tür ilaçların yakın bir zamanda kullanılabileceği düşüncesini taşımaktayız.

## 6.ÖZET

Epo, akut ve kronik merkezi sinir sistemi hastalıklarının deneysel modellerinde tedavi edici etkinliği gösterilmiş bir sitokin-hormondur. Epo, sinir sisteminin gelişimi, korunması ve onarımı süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma ile Epo ve Epo reseptörünün sinir sisteminde ve nöronal hücrelerde bulunduğu saptanmıştır. Epo'in çeşitli hücre kültürü ve deneysel hayvan modellerinde nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir.

Çalışmamızda sıçanlarda intraluminal sutur kullanarak 2 saatlik geçici MCAO oluşturduk. Geçici MCAO'dan sonra sıçanlara Epo ve izotonik uygulayarak nörolojik fonksiyon, makroskobik ve mikroskobik lezyon alanlarını karşılaştırarak Epo'in nöroprotektif etkinliğini araştırdık.

Epo ile tedavi edilen sıçanların nörolojik fonksiyonlarını kontrol grubuna oranla yaklaşık % 25 oranında daha iyi saptadık. Makroskobik olarak lezyon alanında yaklaşık %50 oranında azalma saptadık. Mikroskobik olarak kontrol grubunda görülen iskemik hücre değişikliklerinde belirgin bir düzelme olduğunu saptadık.

Bu bulgular Epo'in çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde klinik uygulama olanağı bulabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel Serebral İskemi, Eritropoietin.

## 7.SUMMARY

Erythropoietin (Epo) is a cytokine-hormone that has been shown to be therapeutic in experimental models of acute and chronic central nervous system disorders. Epo has an important factor on the growth, protection and recovery process of nervous system. In many in vivo and in vitro studies. It has been determined that Epo and Epo receptors was found to be in nervous system. It has been shown that Epo has a neuroprotective effect on various cell culture and experimental animal models.

In this study, by using intraluminal suture, the rats has been exposed to transient MCAO for two hours. After transient MCAO, Epo and Saline has been used and then by the evaluation of macroscopic and microscopic lesion field and neurological functions we have investigated the neuroprotective effect of Epo.

The neurologic function of Epo treated rats was found to be better about 25% than the control groups. We have macroscopically found about 50% reduction in infarct field. We microscopically observed a recovery in ischemia cell changes of Epo treated rats in comparison with saline treated rats.

This findings are suggesting that Epo can find a clinical application in treatment of neurological disorders.

**Key words:** Experimental Ischemic Brain, Erythropoietin.

## 8.KAYNAKLAR

1. Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular disease III. Stroke 1990; 21: 637-676
2. Wolf PA, D'Agastino. Epidemiology of stroke. In: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM (eds), Stroke: Pathophysiology, diagnosis and management. Churchill Livingstone, New York 1998. pp3-28
3. Choi DW:Cerebral hypoxia:Some new approaches and unanswered questions. J Neurosciences 1990;10:2493-2501.
4. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I:Pathophysiology. J Neurosurg 1992; 77: 169-184.
5. Hatano S. Experience from a multi center stroke register: a preliminary report. Bull World Health Organ 1976; 54: 541-553
6. WHO MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project (Monitoring Trends and Determinant in Cardiovascular Diseases): a major collaboration. J Clin Epidemiol 1988; 41:105-114
7. Broderick JP, Phillips SJ, O'Fallon WM, et al. Relationship of cardiac disease to stroke occurrence and mortality. Stroke 1991; 23: 1250-1256.
8. Kurtzke JF, Neuroepidemiology. Ann Neurol 1984; 16:256-277
9. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, et al. A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: The Oxfordshire Community Stroke Project 1981-86: Methodology, demography and incident cases of first ever stroke . J Neurol Neurosurg Psychiatry 1988; 51: 1373-1380.
10. Bonita R, Broad JB, Beaglehole R. Changes in stroke incidence and case fatality in Auckland, New Zealand, 1981 to 1991. Lancet 1993; 342: 1470-1473.
11. Weinberger J. Contemporary Diagnosis and Management of Stroke, 2'nd edition, Handbooks in Health Care Co; Newtown, Pennsylvania. USA, 2002; p:6-10.
12. Adams RD, Victor M. Principles of Neurology. 5'th edition. McGraw-Hill Book Company, New York, 1994; 669-779,
13. Brust JCM. Cerebral infarction. In: Rowland LP.ed Merritt's textbook of Neurology. Ninth edition. Baltimore, William&Wilkins, 1995; pp:246-256.
14. De'Graba TJ, Fisher M, Yatsu FM. Atherogenesis and Strokes. In: Barnett HJP., Mohr JP., Stein BM., Yatsu FM. Ed. Stroke Pathophysiology, Diagnosis and Management. Second Edition. New York: Churchill Livingstone, 1992;pp:29-48.
15. Ertekin C. Nörolojide Fizyopatoloji ve Tedavi. Bilgehan Matbaası, İzmir, 1987: s:627-695
16. Zenbilci N. Sinir Sistemi Hastalıkları Üçüncü baskı. İstanbul Tıp Fakültesi Basımevi 1995; s:325-358.
17. Edvinson L, Mackenzie ET, McCulloch J. Cerebral Blood Flow and Metabolism. New York: Raven Pres, 1993; pp 40, 92, 116, 122, 161, 163, 168, 169, 183, 355, 378, 483, 565-570.

18. Greenberg J, Hand P, Sylvestro A, et al. Localized metabolik-flow couple during functional activity. *Acta Neurol Scand* 1979; 12-13
19. Lebrun-Grandie, Baron JC, Soussaline F, et al. Coupling between regional blood flow and oxygen utilization in the normal human brain: a study with positron tomography and oxygen. *Arch Neurol* 1983; 40: 230-236.
20. Tuor UI, Kelly PAT, Tatemato K, et al. Neuropeptid Y and the cerebral circulation. In: Owman C, Hardebo JE (eds): *Neurol Regulation of brain Circulation* Amsterda: Elsevier, 1986; pp 333-354
21. Brayden JE: Bevan JA. Acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide in the cerebral circulation. Histochemichal and biochemical indises of innervation. In: Owman C, Hardebo JE (eds). *Neurol Regulation of brain Circulation* Amsterdam: Elsevier 1986; pp 371-381.
22. Seylaz J, Hara H, Pinard E. et al. Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Bood Flow Metab* 1988; 8:875-878.
23. Faradi FM. Role of nitric oxide in regulation of basiler artery tone in vivo. *Am J Physiol* 1990; 259;1216-1221
24. Gondsby PJ, Lance JW. Brain stem effects on intra-and extracerebral circulations. Relation to migraine and cluster headache. In: Olesen J, Edvinsson L (eds) : *Basic Mechanisms of Headache*. Amsterdam: elsevier 1988; pp 413-427.
25. Sakas DE, Moskowitz MA, Buzzi MG, et al. Trigeminovascular fibers increase blood flowing cortical gray matter by axon reflex-like mechanisms. *J. Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:831.
26. Furchgott Rf. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53:557-573
27. Olesen J. Quantitative evaluation of normal and pathologic cerebral blood flow regulation to perfusion pressure changes in man. *Arch Neurol* 1973; 143-149.
28. Raper AJ, Kontos Ha, Patterson JL. Jr. Response of pial precapillary vessels to changes in arterial carbondioxide tension. *Circ Res* 1971; 28:518-523.
29. Wahl M, Deetjen P, Thurau K, et al. Micropuncture evaluation of the importance of perivascular pH for the diameter on the brain surface. *Pleguers Arch* 1970; 316: 152-163.
30. Dacey RG Jr, Duling BR. Effect of norepinephrine on penetrating arterioles of rat cerebral cortex. *Am J Physiol* 1984;246: H 380-385.
31. Shalit MN, Reinmuth OM, Shimojyo S, et al. Carbon dioxide and cerebral circulatory control. 3. The effects of brain stem lesions. *Arch Neurol* 1967;17:342-353.
32. Iadecola C. Does nitric oxide mediate the increase in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3913-3916.
33. Wood JH, Kee DB Jr. Hemorheology of the cerebral circulation in stroke. *Stroke* 1985; 16:765-772.
34. Lansman JB. Endothelial mechanosensors; going with the flow. *Nature* 1988; 331:481-482.

35. Moneada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hipertension* 1988; 12:365-372.
36. Farasi FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs. microcirculation. *Am J Physiol* 1991; 261: 1038-1042
37. Prado R, Watson BD, Kuluz J, et al. Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition; effects on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats. *Stroke* 1992; 23: 1118-1124
38. Kozniewska E, Oseka M, Stys T. Effects of endothelium-derived nitric oxide on cerebral circulation during normoxia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 311-317.
39. Strandgaard S, Olesen J, Skinbaj E, et al. Autoregulation of brain circulation in severe arterial hypertension. *Br Med J* 1973; 1:507-510.
40. Goldman MS, Anderson RE, Meyer FB. Effects of intermittent reperfusion during temporary focal ischemia. *J. Neurosurg* 1992; 77: 911-916.
41. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 1981; 54: 773-782.
42. Balkan S. Serebrovasküler hastalıklar. Güneş Kitabevi, Ankara-2002. S:24-35
43. Kogure K, Scheinberg P, Utsunomiya Y, et al. Sequential cerebral biochemical and physiological events in controlled hypoxemia. *Am Neurol* 1977; 2: 304-310.
44. Morawetz RB, Crowell RH, DeGirolami U, et al. Regional cerebral blood flow thresholds during cerebral ischemia. *Ped Proc* 1979; 38:2493-2494.
45. Morawetz RB, DeGirolami U, Ojemann Rg, et al. Cerebral blood flow determined by hydrogen clearance during middle cerebral artery occlusion in unanesthetized monkeys. *Stroke* 1978; 9: 143-149.
46. Symon L, Pastorz E, Branston Nm. The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke* 1974; 5: 355-364.
47. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia .Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J. Neurosurgery* 1992; 77: 337-354
48. Bhatti SU, Selman WR, Lust WD, et al. Techniques of neuroprotection. *Neurosurg Q*, 1991; 1: 197-213.
49. Symon L, Branston NM, Strong AJ. The concepts of thresholds of ischemia in relation to brain structure and function. *Clinical pathology* 1977; 36: 557-565.
50. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of neurology* 1994; 36: 557-565.
51. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol.* 1994; pp 331-351.
52. Strong AJ, Tomlinson BE, Venables GS, et al. The cortical ischemic penumbra association with occlusion of the middle cerebral artery in the cat. 2 Studies of histopathology,

- water content, and in vitro neurotransmitter uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983; 3: 97-108.
53. Bolander Hg, Persson L, Hillered L, et al. Regional cerebral blood flow and histopatologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1989; 20: 930-937.
54. Nedergaard M, Vortstrup S, Astrup J. Cell density in the border zone around old small human brain infarcts. *Stroke* 1986; 17: 1129-1137.
55. Kaplan B, Briant S, Tanabe J, et al. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* 1991; 22: 1032-1039.
56. Korthuis RJ, Granger DK, Townsley MI, et al. The role oxygen derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985; 57: 599-609.
57. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
58. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 1985; 57: 508-516.
59. Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984; 60: 883-908.
60. Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, et al. Blebbing, free  $Ca^{++}$  and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 1987; 325: 78-81.
61. Shibata S, Hodge CP, Pappius HM. Effect of experimental ischemia in cerebral water and electrolytes. *J Neurosurg* 1974; 41: 146-159.
62. Symon L, Branston NM, Strong AJ. Autoregulation in acute focal ischemia. An experimental study. *Stroke* 1976; 7: 547-554.
63. Yamaguchi T, Waltz AG, Okazaki H. Hyperemia and ischemia in experimental cerebral infarctions: Correlation of histopathology and regional blood flow. *Neurology* 1971; 21: 565-578.
64. Diaz FG, Ausman JL. Experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1980; 6: 436-445.
65. Fein JM, Boulos R. Local cerebral blood flow in experimental middle cerebral artery vasospasm. *J Neurosurg* 1973; 39: 337-346.
66. Waltz AG: Effect of  $paCO_2$  on blood flow and microvasculature of ischemic and nonischemic cerebral cortex. *Stroke* 1970; 1: 27-37.
67. Ott EO, Abraham AJ, Meyer JS, et al. Disordered cholinergic neurotransmission and disautoregulation after acute cerebral infarction. *Stroke* 1975; 6: 172-180.
68. Atanabe O, West Cr, Bremer A. Experimental regional cerebral ischemia in the middle cerebral artery territory in primates. Part 2: Effects on brain water and electrolytes in the early phase of MCA stroke. *Stroke* 1977; 8: 71-76.
69. Bremer AM, Yamada K, West CR. Experimental regional cerebral ischemia in the middle cerebral artery territory in primates. Part 3: Effects on brain water and electrolyte in the later phase of acute MCA stroke. *Stroke* 1978; 9: 387-391.
70. Little JR, Cook A, Cook JA, et al. Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia: albumin and erythrocyte transit. *Stroke* 1981; 12: 218-223.



71. Garcia JH, Mitchem HL, Briggs L, et al. Transient focal ischemia in subhuman primates: Neuronal injury as a function of focal cerebral blood flow. *J neuropathology Exp Neurol* 1983; 42: 44-60.
72. Little JR, Kerr FWL, Sundt TM. Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia: an electron microscobic investigation in monkeys. *Stroke* 1976; 7: 25-30.
73. Walz W. Cerebral Ischemia. *Molecular and Cellular Pathophysiology*. 1999; P:7.
74. Kamijyo Y, Garcia JH. Carotid arterial supply of the feline brain. Application to the study of regional cerebral ischemia. *Stroke* 1975; 6: 361-369.
75. Marcoux FW, Moawetz RB, Crowell RM, et al. Differential regional vulnerability in transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1982; 13: 339-346.
76. Gotoh O, Asano T, Koide T, et al. Ischemic brain edema following occlusion of middle cerebral artery in the rat. The time course of the brain water, sodium, and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I- albumin. *Stroke* 1985; 16:101-109.
77. Brierley JB, Brown AW, Meldrum BS. The nature and time course of the neuronal alterations resulting from oligoemia and hypoglycaemia in the brain macaca mulatta. *Brain Res* 1971; 25: 483-499.
78. Brown AW, Brierly JB. The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischemia. *Acta neuropathol* 1973; 23: 9-22.
79. Kirino T, Tamura A, Keiji Sano. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage *Progress of Brain Research*; 74-96
80. Petito CK, Babiak T. Early proliferative changes in astrocytes in postischemic non infarcted rat brain. *Ann Neurol* 1982; 11: 510-518.
81. Garcia JH, Cox JV, Hudgins WR. Ultrastructure of the microvasculature in experimental cerebral infarction. *Acta Neuropath (Berl)* 1971; 18: 273-285.
82. Goldberg WJ, Connor JR, Bernstein JJ. Glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry of spinal cord astrocytes after induction of ischemia or anoxia in culture. *J Neurosci Res* 1987; 17: 168-175
83. Bignami A, Dahl D, Rueger DC. Glial fibrillary acidic GFA Protein in normal neural cells and in pathological conditions. In: Federoff S, Hertz L (eds): *Advances in cellular neurobiology Vol 1*. Academic Press New York, 1980; pp 285-310.
84. Zimmer C, Sampaolo S, Sharma HS, et al. Altered glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat brain following chronic hypoxia. *Neuroscience* 1991; 40 (2): 353-361.
85. Eng LF, DeArmond SJ. Glial acidic protein immunocytochemistry in development and neuropathology. In: *Eleventh international congress of anatomy: Glial and neuronal cell biology*, Alan R. Liss Inc, New York 1981; pp 65-79.
86. Hossmann KA. Treatment of experimental cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982; 2: 275-297.
87. Ratcheson Ra, Ferrendelli JA. Regional cortical metabolism in focal ischemia. *J Neurosurg* 1980; 52: 755-776.

88. Halsey JH, Clark LC: Some regional circulatory abnormalities following experimental cerebral infarction. *Neurology* 1970; 20: 238-246.
89. Brimberger JAC, Eliasson SG: Experimental ischemia and polyphosphoinositide in metabolism. *Neurology* 1970; 20: 357-360.
90. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, et al. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 1978; 9: 445-447.
91. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723-725.
92. Obrenovitch TP, Sarna GS, Symon L. Pharmacology of cerebral ischemia. J. Kriegstein, H.Oberpichler eds. 1990; 97-112.
93. Siesjö BK. Cell damage in the brain caused by ischemia: An overview. *Pharmacology of cerebral ischemia*. J. Kriegstein eds 1986; 3-12.
94. Chesler M, Kraig RP. Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1990; 10: 104-114.
95. Desphande JK, Siesjö BK, Wieloch T. Calcium accumulation and neural damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1987; 7:89-95.
96. Kumral E. Akut İskemik İnme. *İstanbul Argos İletişim*. S:56-68.
97. Kumral K, Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damar Hastalıkları. *İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi*. 1993;165-176.
98. Schrör K. Prostaglandins and other fatty acid peroxidation products in cerebral ischemia. *Pharmacology of cerebral ischemia*. J. Kricgstein eds. 1986; 199-209.
99. Spetzler RF, Williams F. Ischemic neural lesions in cerebral stroke. *Advances in surgery for cerebral stroke*. *Proceedings of the international symposium on surgery for cerebral stroke*, Sendai 1987. Springer Verlag 1987; 549-554.
100. Nishigaya K, Yoshida Y, Sasuga M, et al. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. *Stroke* 1991; 22: 635-642.
101. Katzman R, Clasen R, Klatto I, et al. Report of joint committee for stroke resources IV. Brain edema in stroke. *Stroke* 1977; 8: 512-540.
102. Molinari Gf, Laurent JP. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 1976; 7: 14-17.
103. Hudgins WR, Garcia JH. The effect of electrocautery, atmospheric exposure and surgical retraction on the permeability of the blood-brain barrier. *Stroke* 1970; 1: 375-380.
104. Kamijyo Y, Garcia JH. Carotid arterial supply of the feline brain. Application to the study of regional cerebral ischemia. *Stroke* 1975; 6: 361-369.
105. O'Brien MD, Waltz AG. Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* 1973; 4: 201-206.
106. Little JR. Implanted device for middle cerebral artery occlusion in conscious cats. *Stroke* 1977; 8: 258-260.

107. Spetzler RF, Selman WR, Weinstein P, et al. Chronic reversible cerebral ischemia: Evaluation of a new Baboon model. *Neurosurgery* 1980; 7: 257-261.
108. Morawetz RB, DeGirolami V, Ojeman RG, et al. Cerebral blood flow determined by hydrogen clearance during middle cerebral artery occlusion in unanesthetized monkeys. *Stroke* 1978; 9: 143-149.
109. Molinari Gf. Why model strokes? (editorial). *Stroke* 1988; 19: 1195-1197.
110. Garcia JH. Experimental ischemic stroke. A review. *Stroke* 1984; 15: 5-14.
111. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627-1642.
112. Hayakawa T, Waltz AG. Immediate effects of cerebral ischemia. *Stroke* 1975; 6:321-327.
113. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al. Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1: 53-60.
114. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17: 472-476.
115. Osborn KA, Shigeno T, Balansky AM, et al. Quantitative assesment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol-Neurosurg-Psychiatry* 1987;50: 402-410.
116. Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, et al. Recirculation model following MCA occlusion in rats. *J Neurosurgery* 1985; 63: 272-277.
117. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, et al. A model of focal cerebral ischemic stroke in the rat: Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986; 17: 738-748.
113. Yamori Y, Morie R, Handa H, et al. Pathogenic similarity of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 1976; 7: 46-53.
114. Zeman W, Innes JRM (ed). *Craigie's Neuroanatomy of the rat*. New York, Academic Pres 1963.
115. Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: A neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 1992; 31: 100-107.
116. Kumral E. Akut İskemik İnme. *İstanbul, Argos İletişim*. S: 304-322.
117. Balkan S. Serebrovasküler Hastalıklar. Ankara, Güneş Kitabevi. 2002; S:278-280.
118. Kayaalp S.O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2. Cilt, Hacettepe Taş Kitapçılık,Ankara. 2000; S:1601.
119. Türkiye İlaç Klavuzu 2001 formülleri. S: 403-404.
120. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate*, 2001; 79 (3-4): 228-235.
121. Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J*. 2001; 15 (10): 1804-1806.

122. Juul S, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998; 43 (1): 40-49.
123. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, Schwartz LM, Osborne BA (Ed. ): *Methods in Cell Biology, Cell Death*. Academic Press. San Diego, 1995; 46: 150-181.
124. Morishita E, Masuda S, Nagao M., et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons. and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76 (1):105-116.
125. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow and Metab*. 1999; 19 (6): 643-651.
126. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (19): 10526-10531.
127. Calapai G, Marciano MC, Corica F., et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000; 401 (3): 349-356.
128. Gene S, Kuralay F, Gene K, Akhisaroglu M, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett*, 2001; 298 (2):139-141.
129. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M., et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 253 (1 ):26-32.
130. Siren A-L, Fratelli M, Brines M., et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(7): 4044-4049.
131. Bittorf T, Buchse T, Sasse T, et al. Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B by the erythropoietin receptor. Structural requirements and biological significance. *Cell Signal* 2001; 13(9):673-681.
132. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- $\kappa$ B signalling cascades. *Nature*. 2001; 412 (6847):641-647.
133. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95 (8):4635-4640.
134. Assandri R, Egger M, Gassmann M., . Erythropoietin modulates intracellular calcium in human neuroblastoma cell line. *J Physiol*. 1999; 516: 343-352.
135. Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, et al. Effect of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, 1999; 72 (6): 2565-2572.
136. Buisson, A, Margail L, Callebert J, et al. 129. G. /*Neurochem* 1993; 61:690-696.
137. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. 2001; 276: 39469-39475
138. Ludmila Belayev MD, Yitao Liu MD, Weizhao Zhao PhD; et al. Human albumin therapy of acute ischemic stroke. Marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with therapeutic window. *Stroke* 2001; 32; 553-560.

139. Eurigue Zea Longa, MD, Philip R., et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.1989.
140. Ludmila Belayev, MD: Ofelin F. Alonso, BS; et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model . *Stroke* 1996; 27: 1616-1623.
141. Ohnishi ST, Ph.D, Ohnishi T,Ph.D. Central Nervous System Trauma Research Techniques.P. U.S.A 1995; 132-142.
142. Ludmila Belayev, MD., Raul Buston, B.S., Weizhao Zhao, Ph.D.,et al. Effects of delayed albumin hemodilution on infarction volume and brain edema after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 1997; 87: 595-601.
143. Joshua B, Bederson M.D, Lawrence H, et al. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; Vol 17. No 3.
144. J Mark Braughler, P.H.D., Edward D. Hail, Corelation of metyl prednisolon levels in cat spinal cord with ist effects on (Na + K) ATP ase , lipid peroxidation,and alpha motor neuron fonction *J Neurosurg* 1982; 56: 838 - 844, Buisson A., Margail L, Callebert J., Plotkine M. & Boulu, 129. G. / *J. Neurochem* 1993; 61, 690-696.
145. Caldwell M., O'Neill M., Earley B. & Leonard B. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 260: 191-200, enreich S., Rahn K. H. & Zidek W. 1991; 39:259-265.
146. Huang Z., Huang P. L., Panahian N., et al. *Science* 1994; 265: 1883-1885.
147. Gorio A.;Gokmen N., Erbayraktar S.,et al. Rekombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc. Nat. Acat. Sci.* 2002; 999450-9455.
148. Cheng B. & Mattson M. P. *Neurosci.* 1995; 15: 7095-7104. 88: 205-210.
149. Dame C., Juul S. E. & Christensen R. D. 2001; 79: 228-230.
150. Villa P, Bigini P,T. Mennini T,et al. Erythropoietin Selectively Attenuates Cytokine Production and Inflammation in Cerebral Ischemia by Targeting Neuronal Apoptosis.The *Journal of Experimental Medicine* 2003; Volume 198: Number 6,971-975.
151. Gillardon F., Kiprianova I., Sandkuhler J., et al. M..*Neuroscience* 1999; 93: 1219-1222.
152. Cheng Y., Deshmukh M., D'Costa A., et al. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1992-1999.
153. Martinou J. C., Dubois-Dauphin M., Staple J. K., et al. *Neuron* 1994; 13: 1017-1030.
154. Savitz S.I. & Rosenbaum D. M. *Neurosurgery* 1998; 42: 555-574.
155. Rabuffetti M., Sciorati C., Tarozzo G.,et al. *J. Neurosci.* 2000; 20, 4398-4404.
156. Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, et al. Effects of epoetin alfa on the central nervous system. *Semin Oncol.* 2001 Apr; 28: 66-70