

49642

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

***KOLLAJEN, İNTERLÖKİN-1 VE GLİKOZAMİNOGLİKAN'IN
SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDEKİ NEOVASKÜLARİZASYONA
ETKİLERİ***

UZMANLIK TEZİ

Dr. Metin TUNA

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sebahattin HACİYAKUPOĞLU

ADANA - 1996

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİ	3
3.MATERYAL VE METOD	15
4.BULGULAR	20
5.TARTIŞMA	40
6.SONUÇ	45
7.ÖZET	46
8.LİTERATÜR	48

GİRİŞ VE AMAÇ

Neovaskularizasyon terimi ilk kez 1935 yılında Herting tarafından plasentada yeni oluşan kan damarlarında kullanılmıştır. 1920 yılında millipore filtrelerinden kolayca diffuze olabilen tümör kaynaklı birçok anjiogenik faktör izole edilmiştir. Bunlar polipeptid yapısında asidik ve bazik Fibroblastik Growth Factor (FGF), Anjiogenin, alfa ve β Transforming Growth Factor (TGF) ve lipid yapısında kesin tarifleri yapılamayan faktörlerdir. Bu faktörler endotel hücrelerinde mitozu stimule etmekte, bazende makrofajları mobilize ederek endotelial büyüme faktörlerinin açığa çıkmasını sağlamaktadır⁽¹⁾.

Dokularda neovaskularizasyonu kontrol eden intra ve ekstra vasküler mekanizmalar vardır. Normal doku ve tümör dokusu anjiogenik faktörleri arasında biyokimyasal bakımdan çok önemli bir fark bulunmamaktadır. Fizyolojik neovaskularizasyonla tümör kapillerleri arasında büyüme yönünden fark yoktur. Tek ayrıcalık; tümör vaskularizasyonunun anjiogenik faktör kontrolünde artan şiddette devam etmesidir. Normalde beyin kapiller yapısı vücut kapillerlerinden farklı olduğundan neovaskularizasyonda vücudun diğer bölgelerinden farklıdır. Endotellerde sıkı intersellüler birleşim, artmış mitokondriler, azalmış pinositozis, porlarda azalma mevcuttur. Endotel bazal membranına astrosit foot süreçleri eklenerek kan beyin bariyeri oluşur. Beyin tümörü kan damarlarındaki endotellerde porlar çoğalır, intersellüler birleşimler aralanır, pinositik veziküller artar ve lümene bakan yüzleri katlanır, tubuler yapıların sayısı artar, endotel vakuollerinde ve endoplazmik retikulumda tubuler yapılar ortaya çıkar, böylece endotel proliferasyonu olur. Pinositik veziküllerin açığa çıkması immatür gelişimi temsil eder. Endotellerde bütün bu değişiklikler tümör çevresinde ödeme neden olur⁽²⁾. Beyin tümörleri vücudun diğer bölgesindeki tümörlerden daha fazla neovaskularizasyon gösterirler, güçlü anjiogenik faktörlere sahiptirler⁽³⁾.

Yeni kapillerler küçük veziküllerin filizlenmesinden meydana gelir. Ana venülde yer yer bazal membran bozularak endotel hücreleri anjiogenik stimulusa doğru göç eder ve endotelial proliferasyonla damar filizlenmesi uzayarak, birbiri ile irtibat kurarak kan akımını başlatır⁽⁴⁾.

Endotel hücreleri faktör VIII related antijen, Von Willebran faktör, anjiotensin konverting enzim, matriks materyali (Kollagen, elastin, glikozamino-glikan), kan grubu antijenleri, nörotransmitterler, karbonhidrat-lipid-protein metabolizması enzimleri, hemostazda, permeabilitede ve stimuluslara yanıtta rol alan bir çok madde salgırlar⁽⁵⁾.

Kanser dokusu kanserojenik etki sonucunda transforme hücrelerin aşırı çoğalmasıyla meydana gelir. Böylece heterojen yapıda değişik antijenik özelliğe sahip tümör gelişmeye başlar. Bu tümörlerin avasküler fazı oldukça uzundur. Neovaskularizasyon sonucunda tümör hücreleri büyüyerek invazyon ve metastaz özelliği kazanır. Tümör hücreleri kapiller damarlar ile ilişki kurduktan sonra metastaz yapmaları kolaylaşır. Tümör damarlarının bazal membranları yoktur, bu nedenle tümör hücresinin beslenmesi zorlaşır, hipoksi, asidoz, nekroz meydana gelir. Tümör damarlarının nöron innervasyonları olmadığından arteriollerinde daralma özelliği mevcut değildir. Neoanjiogenik damarın lenfatik sistemi bulunmadığından konakçı bölgenin lenfatik sistemini kullanarak metastaz yapmaktadır. Aynı zamanda yeni oluşan damar tümör hücrelerinin yapıştığı ve hareket kabiliyeti kazandığı laminin ve fibronektinden yoksundur^(6,7).

Yukarda bahsedildiği gibi tümörde kendini besleyecek yeni damarlaşma olmadığı takdirde tümörün büyümesi ve metastaz yapması beklenemez. Çalışmamızda, tümörde neovaskülarizasyon yapabilecek biyokimyasal ve histolojik maddelerin tespit edilerek, bu maddelerin bloke edilmesi halinde neovaskülarizasyonun önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle neovaskülarizasyonda rol oynayan kollajen, interlökin-1 ve glikozaminoglikan normal domuz beyine inoküle edilerek, bir ay sonra biyopsiler alındı. Numuneler ışık ve elektron mikroskopunda incelendi.

Glioblastomda olduğu gibi tümör dokuları konakçı bazal membranını parçalamak için plasminojen aktivatörlerinden serin, sisteinaz, nötral sialik asidi ortadan kaldıran neomidaz, kollajenleri tahrip eden kollajenaz enzimini salgılar. Tümör hücreleri ile ilk ilişki kuran T hücreleri ve interlökin tümör hücrelerine metastaz yapabileceği bilgileri iletir^(5,6,46,65,70,84). Bu nedenlerle neovaskülarizasyonun olduğu dokuda antioksidan etkiye sahip SOD ve yeni damarlaşmanın zar potansiyel enerji ihtiyaını sağlayan ATP-az enzim aktivitesini ölçtük.

Tümör hücrelerinin karakterlerinden olan proliferasyon, invazyon, anjiogenesis ve metastaz karakterleri normal canlıda bulunan lenfosit , monosit, histiosit, makrofaj, trofoblast ve beyinde mikrogliada bulunmaktadır. Bu nedenle, tümörde bunlara ilaveten bazı genetik transformasyonları sağlayan maddelerin bulunması gerekmektedir. Bu maddelerin araştırılarak bulunması, antagonistleriyle tümöral yapının engellenmesi teorik olarak düşünülebilmektedir.

GENEL BİLGİ

Anjiogenezis veya kan damarı oluşumu embriyoda 13-15. günler arasında vitellus kesesinin ekstraembryonik mezoderminde ortaya çıkar. Ovum ve sarı kesede vasküler sistemin erken formasyonu maternal sirkülasyondan oksijen ve besin getirmek için damarlara ihtiyaç duyulmasına bağlıdır.

Kan ve kan damarı formasyonu şu şekilde özetlenebilir:

1- Mezenkimal hücreler ve anjioblastlar kan adaları olarak bilinen şeritleri ve izole kitleleri oluşturmak için birleşirler.

2- Bu adalar içinde boşluklar meydana gelir.

3- Anjioblastlar primitif endotelyumu oluşturmak için kavite çevresinde düzenli olarak sıralanırlar.

4- İzole olan damarlar endotelyal kan şebekelerini oluşturmak için birleşirler.

5- Birbirinden bağımsız olarak meydana gelen damarlar birleşirler ve endotelyal tomurcuklanma yoluyla bitişik alanlara uzanırlar.

Vitellus kesesi ve allantoisdeki damar gelişiminde olduğu gibi primitif plazma ve kan hücreleri de endotelyal hücrelerden gelişirler. Embriyoda kan oluşumu 5. haftada ilk olarak embryonik mezenkimalin çeşitli kısımlarında, karaciğerde daha sonra dalakta, kemik iliğinde ve lenf nodüllerinde başlar. Primitif endotelyal damarları kuşatan mezenkimal hücreler damarların musküler ve konnektif doku yapılarını oluşturmak için farklılaşırlar⁽⁶¹⁾.

Santral Sinir Sistemi Vaskülarizasyonunun Embryogenezini

Santral sinir sisteminin (SSS) vaskülarizasyonu nöral tübün gelişimsel değişikliklerine uyum sağlar. Embryonik gelişimin erken döneminde nöral tüb özel epitelyal bir doku (nöroektoderm) olduğu için damarsızdır. Nöral tübün vaskülarizasyonu; diferansiyasyon ve maturasyonla eşzamanlı olarak kaudalden kraniale doğru adım adım ilerleyerek devam eder. Gelişen SSS'nin belli bir bölgesinde, embryonik damarlar (1) ilk olarak bu bölgeyi kuşatacak şekilde organize olurlar, (2) anatomik bariyer oluşturan SSS eksternal bazal lamina ve marginal gliayı delerler, (3) SSS'nin büyüyen yapısına ve fonksiyonel gereksinimine adapte olabilmek için büyümekte olan nöral doku içinde gelişmeye devam ederler. Böylece gelişen SSS'nin bütün bölgelerinin ilk vaskülarizasyonunda üç farklı vasküler bölge ortaya çıkmaktadır. Bunlar; sırasıyla perinöral, internöral ve intranöral vasküler bölgelerdir. Bu üç vasküler bölge nöral dokuyu kuşatır. Her vasküler bölge birbiriyle ilişkili olarak farklı ve spesifik doku kompartmanları içinde art arda gelişir. Her bölge farklı damar tipleri meydana getirir. SSS'nin ana arter ve venöz sistemleri; perinöral vasküler bölge ve meningeal kompartman içinde gelişir. Perforan arteriol ve venüller VRK (Virchow-Robin Kompartmanı) içinde sinir dokusuyla uyumlu olarak gelişir. Daha sonra kapiller damarlar sinir dokusunu penetre ederek SSS'nin intranöral vasküler bölgesine nüfuz ederler.

Perinöral Vasküler Bölge

Vaskülogenezis genç embryonun mesoderm, vitellus kesesi ve gövdesinde bulunan birleşik anjioblastik hücre adalarında başlar. Bu adalarda hücresel elementlerin kanalizasyonu ile sonuçlanan

progresif sitoplazmik likefaksiyon oluşur. Anjioplastik adaların progresif kanalizasyonu; sıkı bağlantılar ile biraraya gelen birkaç endotel hücre karışımı ve büyük, irregüler presirkülator primordial pleksus formasyonu içinde sonuçlanır. Bunlar ince ve immatür bazal lamina tarafından sarılır ve etkin şekilde çoğalarak gelişir. Vasküler yapının sınırları bazal laminadan yoksun bırakılır ve endotelial hücreler kendi çevresini kuşatan doku içine ilerleyebilen birçok uzun filopodia meydana getirir. Embryoda en belirgin ve erken gelişen vasküler pleksus kranial olanıdır. İnsan embriyonu gelişiminin dördüncü haftasında kranial plexus belirginleşir. Yetişkin beynini karakterize eden bazı ana arterler, venler ve venöz sinüsler altı haftalık iken tanınabilir.

SSS vaskülarizasyonu myelencephalonda başlar ve metencephalon, mesencephalon, diencephalon, striatum ve vaskülarize olan en son bölge olan telencephalon'a doğru progresif olarak devam eder. Böylece, SSS'nin diferansiyasyonuna ve matürasyonuna uyum sağlayan vaskülarizasyon tedrici şekilde artarak yukarıya doğru devam eder. İnsan embriyonunun yedinci gestasyonel haftasında; medulla, pons, diensefalon ve striatumun vaskülarizasyonu hala devam etmektedir. Bununla beraber serebral korteksin intrinsik damarlanması yetersiz durumdadır. Serebral korteks'in vaskülarizasyonu; önce ventralden başlar daha sonra lateral ve medial bölgelere ulaşır.

SSS'nin vaskülarizasyonu başlamadan önce embriyonik meningesler iyi damarlanmıştır. Dura, araknoid ve piamater ayırtedilebilir, fakat bunların arasında boşluk yoktur. Bununla beraber embriyonik meningeslerin kan damarları üç farklı tabakaya ayrılabilirler. Dış tabaka SSS venöz sinüslerini meydana getirecek olan dural damarları, en geniş olan intermedial tabaka SSS'nin ana arteriyel ve venöz sistemlerinden dağılan araknoidal damarları, iç tabaka pial vasküler pleksusdan dağılan pial damarları içerir. Embriyonik pial pleksus gelişen SSS'nin bütün yüzeyini örter ve değişken eksternal morfolojiye adapte olur. Embriyonik pial pleksusun formasyonu en önce ortaya çıkar. Gelişen SSS'nin çeşitli bölgelerine giren bütün perforan damarlar pial vasküler pleksusdan orjin alırlar. Dural, araknoidal ve pial damarları içeren bütün meningeal damarlar SSS perinöral vasküler bölgesini oluştururlar.

Kranial vasküler pleksusun daha sonraki gelişimi karmaşıktır. Çünkü birbirleriyle ilişkili, fakat üç farklı vasküler sistemin (dural, araknoidal ve pial) birlikte oluşumunu kapsar. Perinöral damar yapısı büyüyen beynin değişen eksternal morfolojisine sürekli olarak adapte olur. Serebral korteks beynin anterior ucunda küçük bir vezikülden bütün kranial kaviteyi dolduran büyük bir yapıya gelişir. Perinöral damarlar tarafından meydana getirilen ilk anastomotik pleksus; büyüyen ve genişleyen bölgeler etrafında yeni bağlantıların eklenmesiyle (anjiogenesis) ve artık gerek olmayan diğerlerinin eliminasyonu (reabsorpsiyon) sürekli şekil değişikliğine uğrar. Embriyonik araknoidal ağın gevşek yapıları organizasyonu ve vasküler zenginliği adaptasyonlar için ideal bir yapı sağlar.

Embriyonik gelişim boyunca; araknoidal damar ağı pial vasküler pleksus venleriyle ve ana arterlerle bağlantısı olan değişik çaplardaki birçok damarlarla birleşerek geniş bir alana dağılır. Bağlayıcı araknoidal damarların büyüklüğü, sayısı, lokalizasyonu, dağılımı kapiller anjiogenesis ve reabsorpsiyon yoluyla yeniden düzenlemelere uğrar. Gelişimin erken döneminde, bu damarlar büyük,

irregüler, ince duvarlı olup sıkı bağlar ile birleşmiş birçok endotel hücrenin karışımından meydana gelmiştir. Tomurcuklanma yoluyla aktif olarak büyüyen, ayırtedilemeyen birçok arter ve venler vardır. Gelişimin sonraki dönemlerinde araknoidal arterler ve venler kendilerini BOS kompartmanından ayıran araknoidal hücrelerce kuşatılırlar.

İnternöral Vasküler Bölge

Pial damarlar erken intrinsik vaskülarizasyonda en önemli rolü oynarlar. SSS'nin ana arteryel ve venöz sistemi araknoidal birleştirici damarlarla birlikte kanı sadece taşıyan damarlar olarak düşünülebilir, pial damarlar ise koroid pleksusların ve bütün SSS bölgelerinin intrinsik vaskülarizasyonuna direk olarak iştirak ederler.

Pial vasküler pleksus embriyonik hayatta intrinsik vaskülarizasyondan önce beyin yüzeyini kuşatır. Gebeliğin 50. gününde pial pleksus gelişen korteks yüzeyinin damarlanmasını tamamlayarak, korteks yüzeyinden derin yapılara doğru damarların gelişimini sağlar. Koroid pleksusların vaskülarizasyon gelişimi tela koroidea'dan sağlanır.

Pial Pleksusların Oluşumu ve Organizasyonu

Pial pleksus ana arterler ve venlerle bağlantısı olan birleşik araknoidal damarlar yoluyla kanlanır. Bu pleksus tek veya birkaç endotel hücre sıralı olmak üzere değişik büyüklükteki damarların birbirleriyle birleşmesinden meydana gelmiştir. Bunlar gelişmekte olan korteks yüzeyinde yaygın şekilde kısa bağlantılı anastomotik pleksuslar yaparlar. Pial pleksus sürekli olarak genişler, değişen SSS'i yüzeyinin dış morfolofisine kapiller anjiogenesis ve reabsorbsiyon yoluyla adaptasyon gösterir.

Pial damarlar ; kollajen lifler, doku boşlukları ve pial hücrelerin endoplazmik uzantıları ile birbirlerinden ayrılırlar. Embriyonik pial hücreler ; fibroblastların (kollajen formasyonu), mesodermal hücrelerin (fagositosis), ve epitelyal hücrelerin (epitelyal benzeri lamellerin formasyonu) özelliklerine sahiptirler. Pial damarların aktif anjiogenesis alanlarında ince bazal laminaları vardır. Büyüyen damarların endotel hücrelerinin karakteristik bazı özellikleri vardır, lümenlerinin içine ve dışına projekte olan psodopodlar ve filopodlarla önemli membran aktivitesi gösterirler. Aynı zamanda bol miktarda granüler endoplazmik retikulum içerirler. Bu yoğun materyal birikimi çoğu kez endoplazmik retikulumun dilatasyonuna neden olur. Bu materyalin natürü hakkında iki olasılık düşünülmektedir; Birincisi, yeni meydana getirilen damarın bazal laminasının yapımı için proteinöz sekresyon olabileceğidir ; ikincisi, bu materyalin gelişen damarın yapımı devam eden endotel hücreleri arasında ilk lümen (kanalizasyon) formasyonunda kullanılabileceğidir.

SSS Yüzeyinin Pial Vasküler Perforasyonu

Vasküler perforasyonda başlıca üç aşama gösterilmiştir. Önce, pial damarlar büyümekte olan SSS'i yüzeyine yaklaşır ve doğrudan yüzeye temas kurarlar. Daha sonra, glia'ya ulaşan damarlardan çıkan endotelial filopodlar bütün vasküler ve SSS'i bazal laminası içine girerek sinir dokusu içine nüfuz ederler. Endotelial hücreler ilk lokalizasyon bölgesinde çoğalarak sinir dokusu içine dağılırlar. Böylece; penetre olan endotelial hücrelerin proliferasyonu yeni intranöral damarların oluşumuyla sonuçlanır. Filopodial perforasyon vasküler ve SSS bazal laminasının bitişik olduğu alanlarda

görülür. Filopodialar genellikle bitişik glial sonlanmalar arasında SSS dokusuna girerler. Filopodialar sinir yapıları içinde ilerlerken bazal laminaları yoktur. Bu tip perforasyon öncü endotelyal hücrelerden veya gliaya ulaşan kapiller hücrelerden gelen birkaç filopodia ile sağlanır. Filopodialar arasındaki glial sonlanmalarda şişme, vakualizasyon ve miyelin figürlerin oluşumu ile membranlarında parçalanma meydana gelir. Embriyonik kapillerlerin endotelial filopodiaları anatomik bariyerler içine nüfuz ederek glial sonlanmalarda fokal membran parçalanmasına neden olurlar. Bu aktif işlemin natüri bilinmemektedir, muhtemelen endotelyal filopodialar tarafından yapılan proteolitik enzimlerle meydana gelmektedir. Öncü filopodia SSS ile damar basal laminasının bitişik olduğu bölgelerde santral bir açıklık yaratır ve daha sonra tüm endotelyal hücreler bu açıklıktan sinir dokusu içine penetre olurlar. Her iki basal laminanın füzyonuyla damar duvarı ve SSS yüzeyi arasında anatomik devamlılık kurulur.

Yeni İntranöral Damarların Formasyonu

Penetre olan endotelyal hücrelerin art arda proliferasyonu yeni bir intranöral damar oluşumu ile sonuçlanır. Yeni oluşan intranöral damar sinir dokusu içinde ilerler. Endotelyal hücreler çevresindeki glial sonlanmalarda şişme ve membran bozulması meydana gelir, miyelin figürler sıklıkla bu alanlarda görülebilir. Yeni oluşan damarların sinir dokusu içinde uzamasıyla, bu damarlar çevresinde yeni glial işlemler başlar. Bu yeni perivasküler glial yapım SSS yüzeyinin kenar gliasıyla devamlılık gösterir ve art arda bazal lamina materyaliyle sarılır. Böylece, perforan damar SSS yüzeyi ile devamlılığı olan yeni bir glial duvarla sinir dokusundan ayrılır. Ayrıca, perforan damar çevresindeki glial embriyonik duvar SSS yüzeyine benzerlik gösterir. Perforan damarın proksimal kısmı (SSS yüzeyine yakın) sinir dokusu ve embriyonik VRK dışında tutulur. Bununla beraber perforan damarların öncü endotelyal hücreleri matür bazal laminası olmadan sinir dokusu içinde serbestçe ilerlemeye devam eder. Vasküler perforasyonların değişik evreleri SSS'nin bütün bölgelerinde erken gelişim sırasında dikkati çeker. Serebral kortekste; yeni vasküler perforasyonlar bütün prenatal gelişim boyunca görülür. Korteks gelişmesine devam ederken, daha önce meydana gelen yapılar arasında yeni vasküler perforasyonlar meydana gelir. Pial damarların sinir dokusuna girmek için eksternal bazal lamina ve SSS yüzeyinin kenar gliasını perfore ederler. Böylece, embriyonun gelişimi sürecinde SSS vasküler yapısı kan akımı yönünde gelişir. Sonuç olarak; damarlar girişte arteriollere, çıkışta ise venüllere transforme olurlar.

VRK ve İnternöral Vasküler Bölgenin Oluşumu

Perforan damarın giriş yeri çevresinde meydana gelen ilk pial-funnel; her iki bazal laminanın füzyonuyla embriyonik gelişim sürecinde önemli modifikasyonlara uğrar. İki bazal lamina arasında pia mater boşluklarının birleşmesiyle yüzeyel bir mesafe meydana gelir. Bu mesafe aşağıya doğru uzar ve kısa bir uzunluk boyunca sinir dokusu girişine kadar perforan damarlara eşlik eder. Daha sonra pial sellüler elementler, kollajen lifler ve nonendotelyal paravasküler sellüler elementlerle invazyon meydana gelir. Böylece, orjinal pial-funnel progresif olarak VRK olarak bilinen farklı bir perivasküler kompartmana transforme olur. Embriyonik VRK SSS yüzeyi kenar gliasına benzeyen glial duvarla çevrilmiş hale gelir. VRK pial boşluktan bağlantısız olduğundan sinir dokusunun

tamamen dışında spesifik bir perivasküler kompartmana transforme olur. VRK damar duvarı ve sinir dokusu glial duvarı arasında oluşur. VRK 'ndaki embriyonik damarlar nöral parankimi penetre etmeksizin, sinir dokusu içinde oldukça derinlere ulaşabilen arteriol ve venüllere transforme olur. Serebral korteksin VRK beyaz maddeye kadar ulaşabilirse, damarları sinir dokusu arasında çevrili durumda kalır. VRK'nın drenajı meningeal kompartmanların drenajından farklıdır, araknoidal perivasküler doku boşluklarıyla ve lenfatik sistemle bağlantısı vardır.

Embriyon gelişiminde orjinal pial perforan damarlar genişlerken VRK damarları araknoidal damarlarla birleşirler. Bazı adult perforan damarlar pial vasküler pleksus ile orjinal ilişkisini kaybeder, böylece araknoidal damarlardan SSS'ne direkt olarak çapraz bağlantılar meydana gelir. Arterioller ve venüller kadar küçük perforan arterler ve venlerde bu gelişimsel modifikasyonlara uğrarlar. VRK'dan çıkan küçük damarlar uygun yerlerde sinir dokusunu penetre ederler. Penetrasyon yerinde VRK kaybolur, sinir dokusuna penetre olan damara eşlik eden yapılarla vasküler ve SSS basal laminası yeniden birleşir. Yeni perforan damarlar gelişen SSS yapısı içinde kısa bağlantılı anastomotik pleksuslar oluşturarak aktif şekilde büyürler. Sinir dokusunda yaygın intranöral kapiller yataklar meydana getirirler. Bunlar SSS damarlanmasının intranöral vasküler bölgesini oluştururlar.

Yeni oluşan intranöral kapillerler sinir elementleri arasında ilk önce serbest olarak büyürler, daha sonra perivasküler glial yapıyla kuşatılırlar. İnanöral kapillerler tek bir basal lamina (vasküler ve SSS basal laminasının yeniden füzyone olmasıyla meydana gelir) ve onları diğer nöral elementlerden ayıran perivasküler glia ile kuşatılırlar. İnanöral perivasküler glial yapı VRK'ndan anatomik olarak bağımsız olan spesifik bir doku kompartmanıdır. Böylece, intranöral kapiller içinde sirküle olan kan vasküler glial bariyerle(kan-beyin bariyeri) nöronal elementlerden ayrı tutulmuş olur.

VRK vertikal olarak uzadığı gibi, değişik seviyelerde SSS yüzeyini penetre eden yeni damarlar vermeye devam eder. VRK'dan gelen penetran kapillerlerin sayısı kortikal gelişim boyunca artar. Penetran kapillerler bitişik VRK'ları arasında kısa bağlantılı anastomotik pleksuslar meydana getirirler. Bu anastomotik pleksuslar kapiller anjiogenezis ve reabsorbsiyonla devamlı gelişimsel yeni şekillenmelere uğrarlar. Penetran kapillerler ve anastomotik pleksuslar intranöral vasküler yapıyı ve kan-beyin bariyerini meydana getiren elementlerdir.

Büyüyen endotelial hücreler nöral elementler arasında basal laminası olmadan serbestçe büyüyen bir çok uzun filopodia meydana getirir. Filopodialar orjinal endotelial hücrelerden radial olarak çıkarlar ve oldukça uzak bölgelere kadar büyürler. Uzunlukları 20 - 40 μm , çapları 0.3 - 0.6 μm arasında değişir. Büyüyen kapillerlerin filopodiaları; ana damarların büyüme yönünü belirleyen yol gösterici faktörler (anjigenetik faktörler) olarak düşünülmektedir.

İnanöral kapillerler SSS içinde kısa bağlantılı anastomotik pleksuslar yaparlar. İnanöral kapiller anjiogenesis büyüyen SSS bölgelerine uyum göstererek gelişir. Serebral kortekste, ilk bilinen anastomotik pleksus paraventricüler matriks zonda meydana gelir, bu bölge gelişen SSS'de diferensiasyonun başladığı ilk bölgedir. Anastomotik pleksuslar daha sonra kortikal plak formasyonunda 1. ve 7. tabakalarda meydana gelir. Bu ilk anastomotik pleksuslar kapiller

angiogenesis ve reabsorbsiyonla SSS yapı ve fonksiyonuna uyum sağlamak için sürekli modifikasyonlara ve yeni şekillenmelere uğrarlar. İntranöral anastomotik pleksus; gelişen ve farklılaşan zonlarda yeni bağlantıların eklenmesiyle(kapiller anjiogenesis) ve daha sonra ihtiyaç görülmeyen diğer bağlantıların iptal edilmesiyle(kapiller reabsorbsiyon) gelişimini tamamlar.

SSS vaskülarizasyonunun üç farklı, spesifik vasküler bölgelere ayrılması ve eşlik eden doku kompartmanları; bu bölgeler arasında fonksiyonel farklılıklar kadar önemli yapısal farklılıklar olduğunda gösterir(Tablo1). Sadece intranöral kapillerler (intranöral vasküler bölge) kan-beyin bariyeriyle kuşatılmıştır, meningeal ve Virchow-Robin damarları kan beyin bariyerinden yoksundur⁽⁹⁷⁾.

Tablo-1
SSS Damar Yapısının Oluşumu.

Bölgeler	Damarlar	Kompartmanlar
Perinöral }	- Dış: Venöz sinüsler	Dura mater
	- İntermediat damarlar: Arteryel ve venöz sistemler, araknoid, bağliyan damarlar.	Araknoid
	- İç: Pial vasküler pleksus	Pia mater
İnternöral }	Perforan damarlar, arterioller ve venüller.	Virchow-Robin
İntranöral }	Penetran kapillerler	Perivaslüler glia

KOLLAJEN

Kollajen rigid ve uzatılamayan ekstraselluler bir matriks proteindir. Tendonların ve birçok konnektif dokunun ana yapı taşıdır. Elektron mikroskopunda, kollajen fibriller 680 Å aralıklarla tekrar eden ayrı bir bantlı paterne sahiptir. Bu fibriller müstahzarın modeline ve kaynağına bağlı olarak değişen kalınlıklardadır. Fibriller yandan yana zigzag tarzda kümeleşen 3.000 Å boyunda kollajen moleküllerinden meydana gelir. Kollajenin analizi glisin, prolin ve hidroksiprolinin dominant olduğu alışılmışın dışında bir aminoasit yapısı göstermiştir. Bundan başka polipeptid zincirlerinin yapısı tekrarlayan bir tripeptid sırasında dizilen aminoasitler gösterir, bunlar Gly-X-Y, X sıklıkla prolindir, Y ise sıklıkla hidroksiprolindir. Bu alışılmışın dışında olan amino asid sırası ve benzersiz kırılma modeli kollajenin tamamen farklı bir fibroz protein olduğunu düşündürmüştür⁽⁹⁸⁾.

HEPARİN

Glikozaminoglikanlar (Heparin, Kondroitin sülfat ve Dermatan sülfat, Hıyaluronik asid, Keratan sülfat) ve proteoglikanlar pek çok eklentileri olan kümeler oluştururlar. Bu kümeler rijid, jel gibi maddeleri ekstrasellüler matrikse verir. Muhtemelen bu bileşiklerden dolayı oluşan bir çok daha spesifik reaksiyonlar görülür. Halen belirtilmektedirki, ekstrasellüler matrikste bu moleküllerin organizasyonu ve reaksiyonları hakkındaki bilgiler nisbeten azdır. Glikozaminoglikanlar içinde en

çok bilinen heparindir. Bu bileşik son derece spesifik bir antikoagulan olarak fonksiyon görür. İlk olarak, heparin plazma proteini antitrombin III ile kompleks meydana getirir. Bu kompleks dolaşımında kan pıhtılaşma sisteminin serin proteazlarını inhibe eder⁽⁸⁾.

İNERLÖKİN -1 (İL-1) (Sitokinler)

Sitokinlerin fonksiyonu injuriye karşı verilen immunolojik, inflamatuvar ve onarım yanıtlarını düzenlemektir. Bir çok hormon benzeri polipeptidler immunolojik ve inflamatuvar yanıtlarda sekrete edilirler. Sitokinler lenfositlerde üretilir ve lenfokinler olarak adlandırılırlar, monositlerde veya makrofajlarda üretilen peptidlere de monokinler adı verilir. İntersellüler haberleşmeyi sağlayan sitokinler lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtları düzenlerler. Sitokinler özel glandlardan ziyade çok sayıda hücrelerde üretildiklerinden endokrin hormonlardan farklıdırlar. Sitokinler serumda genellikle bulunmazlar ve genel olarak uzaktaki hedef hücelere endokrin tarzdan ziyade parakrin (lokal olarak üreten hücelere yakın) yada otokrin (direk olarak üreten hücelere) olarak etki ederler. Sitokinler yabancı antijenlere, lökosit ve diğer hücrelerin farklılaşması sonucu meydana gelen zararlı ajanlara karşı konağın reaksiyonunu modüle ederler.

Transforme lenfosit, makrofaj, keratinosit ve fibroblast hücreler spontan olarak kültür ortamına sitokinleri sekrete ettiklerinde, normalde istirahat halinde olan hücreler sitokinleri üretmek için stimüle olurlar. Bağışık olan donörlerden elde edilen T ve B lenfositler lenfokin üretmek için antijenlerle spesifik olarak aktive edilebilirler. Çoğu sitokinler aktive olan hücreler tarafından simultane olarak üretilirler ve birini diğerinden isole etmek zordur. Sitokinler (Tablo-2a) genel olarak molekül ağırlığı 6000-60000 arasında değişen peptidler veya glikoproteinler olarak sentez edilip sekrete olurlar. Sitokinler son derece güçlü bileşiklerdir, 10^{-10} - 10^{-15} mol / L konsantrasyonlarında hedef hücrenin fonksiyonlarını stimüle etmek için spesifik reseptörlere bağlanarak etkileşimleri başlatırlar.

Artılmış tek bir sitokin bir çok hücre tipinin büyüme ve farklılaşmasında çeşitli etkilere sahip olabilir. Bunun sonucunda; lenfoid, miyeloid ve konnektif doku hücrelerinde sitokinlerin biyolojik etkilerinde bir kaç katı artma meydana gelebilir.

Tablo - 2-a
İnterlökin -1'in Karakteristik Özellikleri

Sitokin	Molekül ağırlığı	Ana hücre kaynakları	Aktivasyonun pirimer tipi	Esas etkiler
İL-1	17500	Makrofajlar ve diğerleri	İmmun güçlendirici	İnflamasyon ve hematopoetik

İnterlökin-1 birçok immunolojik, inflamatuvar ve onarım aktiviteleri olan iki farklı peptid'den meydana gelir. İL-1 keratinositler, dendritik hücreler, astrositler, mikroglial hücreler, normal B lenfositler, kültüre edilen T hücre kolonileri, fibroblastlar, nötrofiller, endotelial hücreler ve düz kas hücreleri gibi birçok dokudan ve özellikle 11 çeşit makrofaj tarafından üretilirler. Ayrıca, İL-1-benzeri faktörler belli başlı bütün nükleotid hücre tipleri tarafından salgılanır. Çok sayıda hücre

toplulukları az miktarda İL-1 üretirlerde, normal hücreler İL-1 üretimi için çeşitli ajanlar tarafından stimüle olmalıdırlar. İL-1 üretimi lipopolisakkarit(LPS), muramil dipeptid(MDP), zararlı ultraviyole ışınları, urat veya silikat parçaları, alüminyum hidroksit ve mikroorganizmalar gibi çeşitli ajanlarla uyarılır. Stimülanların natürüne göre İL-1 intrasellüler olarak depolanır veya hücre dışına salınır. Silika parçaları ve forbol miristat asetat(PMA) öncelikli olarak İL-1 salınımını uyardığı halde; latex parçaları, LPS ve zimosan, intrasellüler ve ekstrasellüler İL-1 seviyelerinde artma şeklinde uyarıda bulunur. İL-1 sekresyonunu düzenleyen intrinsik sellüler faktörler bilinmemektedir, fakat hücre yaralanması nedenlerden biri olarak gösterilmektedir.

İL-1 İL-1alfa ve İL-1β denilen 2 moleküler şekilde bulunur. İL-1alfa ve İL-1β 'nın potansi ve aktiviteleri benzerdir, aynı hücre yüzeyi reseptörlerine eşit afinite de bağlanırlar. İL-1alfa ve İL-1β ilk olarak propeptidler(Molekül ağırlığı 31000) olarak translate edilir, hücre membranının dışında çözülebilir ürün şekline(Molekül ağırlığı 17000) enzimatik olarak işlenir, sonra ekstrasellüler olarak etki ederler. Biyolojik olarak aktif İL-1alfa ve aktif olmayan İL-1β hücre yüzeyinde tespit edilmiştir. Böylece hücreden hücreye iletişim kurma sırasında etkileşimlere katılabilirler.

İL-1 plasma membranındaki reseptörlere yüksek afinite göstermek suretiyle hedef hücreyi etkiler. Bu reseptörlerin sayısı T hücrelerde yaklaşık 100 civarında, fibroblastlarda birkaç bin olmak üzere değişkenlik gösterir. Fakat afinitesi nispeten değişmezlik gösterir($K_d=10^{-10}$ mol / L), çoğu hücre tiplerinin İL-1 reseptörlerine sahip oldukları düşünülmektedir. 21 aminoasit transmembran bölgesi ve 217 aminoasit sitoplazmik uzantısı vardır. Hücre yüzeyi üzerindeki İL-1 reseptörlerinin tanımlaması İL-1 bağlanmasını takiben hücre içi haberleşme ile düzenlenir. İL-1 'in reseptöre bağlanmasını takiben meydana gelen intrasellüler olaylar hala kesin olarak anlaşılmamıştır, bununla beraber diacylglycerol, siklik AMP(cAMP), G proteinleri ve ornitin dekarboksilaz'ın artan seviyeleri bazı hücre tiplerinde tespit edilmiştir⁽⁴⁰⁾.

SERBEST RADİKAL TEORİSİ

Dünya üzerinde hayatın başladığı ilk zamanlarda serbest oksijenin yer almadığı, ancak bir milyar yıl içerisinde fotosentetik organizmaların görünmesiyle fotosentezin bir yan ürünü olan oksijenin varlığı önem kazanmaya başlamıştır. Ancak beş atmosfer basınçta ani ölümlere neden olduğu gösterilmiştir. Bu tablonun oksijen toksitesi ile ilgili olduğu kesinlik kazanmıştır. Oksijen toksitesine moleküler oksijenin (dioksijen) neden olduğu bugünkü bilgilerimiz içerisinde yer almaktadır. Son günlerde yapılan araştırmalar serbest radikallerin moleküler oksijenin redüksiyon ürünü olduğunu göstermiştir. Bu ürünler süper oksit anyonu, hidroksil radikali (OH⁻) hidrojen peroksit (H₂O₂) ve singlet oksijendir^(30,34).

Çoğu biyolojik moleküller genel olarak en düşük enerji seviyelerinde singlet spin durumunda bulunurlar. Oksijenin en düşük enerji seviyesinde triplet spin durumunda bulunması biyolojik oksitlenme olayını yavaşlatan fakat önleyemeyen önemli bir faktör olarak önem kazanmıştır⁽²²⁾.

Süperoksit Anyonu Üretimi

Süperoksit tanımı ve toksik etkisi ilk defa 1971 yılında McCord⁽⁵⁹⁾ ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu bileşiğin oluşması ilk Czapski ve Ilan⁽¹⁶⁾ ve Fee⁽²¹⁾ tarafından açıklanmıştır.



Carrel⁽²²⁾ ve arkadaşları tarafından eritrositlerde oksihemoglobinin methemoglobine sabit dönüşümü sonucu süperoksit radikali üretildiği açıklanmıştır. Süperoksit anyonu üreten eritrosit dışında diğer bir sistem ise makrofajlardır.

Hidrojen Peroksit Üretimi

Ksantin oksidaz, deamino asit oksidaz ve süperoksit enzimlerinin katalitik etkileri sonucu, hidrojen peroksit üretildiği değişik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Ksantin oksidaz enzimi ksantinün ürik aside dönüşümünü katalize etmektedir⁽¹⁸⁾.

Oksijen Toksitesinin Mekanizması

Oksidatif hasara karşı majör koruyucu mekanizmanın zarın yapısal bütünlüğünden kaynaklandığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu sonucu, zar yapısındaki geçirgenlik sisteminde gözlenen bozukluklar, sodyum, kalsiyum ve magnezyum gibi katyonlara geçirgenliğini etkilediği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Ancak oksidatif hasara bağlı olarak potasyumun hücre zarındaki geçirgenlik kinetiğinin bozulduğu yapılan araştırmalarla kesinlik kazanmıştır^(66,67).

Serbest Radikallere Karşı Koruma Mekanizması

Hücrelerin serbest radikallere karşı oluşturduğu koruma mekanizmaları genellikle dört başlık altında toplanır.

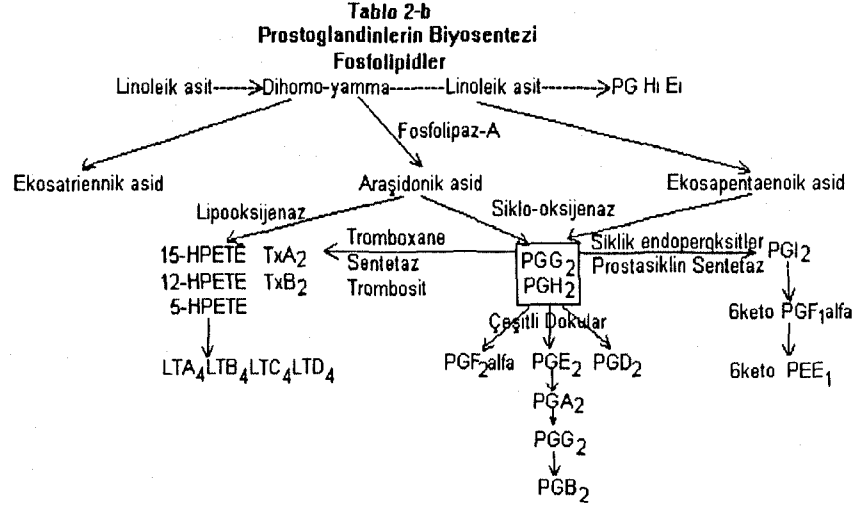
Bunlar sırasıyla:

1. Süperoksit dismutaz reaksiyonları.
2. Katalaz reaksiyonları.
3. Glutatyon peroksidaz.
4. Antioksidantların etkisi.

Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir. Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini; katalaz ve glutatyon peroksidaz ise hidrojen peroksidi metabolize ederler. Bu enzimlerin aktif oluşu daha zararlı olan hidroksit radikali oluşumunun engellendiğini gösterir^(24,59).

Hücrede hem sitozol hem de mitokondride bulunan bir enzim olan süperoksit dismutaz, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. Bazı çalışmalara göre serbest oksijen radikallerinin PG oluşumunu stimüle ettiği ortaya konmuştur⁽³⁾.

Serbest radikallerin toksik etkisi sonucu hücre membranını atake ettiği ve lipid peroksidasyonu yoluyla membran fosfolipidlerinden prostaglandin sentezi yolunu başlattığı bilinmektedir (Tablo 2-b). Bu radikaller ayrıca prostasiklin sentetazı inhibe ederek prostasiklin oluşumunu azaltırlar.



Herhangi bir travmaya maruz kalan doku, immunolojik olan veya olmayan etkene karşı, fagositik hücrelerle cevap vermeye çalışır (Tablo 3). Fagositik hücrelerin en çok çalışanları nötrofiller, monositler ve doku makrofajlarıdır. Nötrofillerin ve makrofajların aktivasyonu respiratuar bir patlamayla sonuçlanır⁽⁴⁵⁾. Bu da Heksoz Mono Fosfat (pentoz fosfat, HMP) yolu üzerinden glikoz metabolizması ile oksijen tüketiminde 2-20 kat artışa neden olur. Oksijen tüketimindeki artışla birlikte nötrofiller ve makrofajların süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) salgıladıkları gösterilmiştir^(45,42).

Tablo - 3

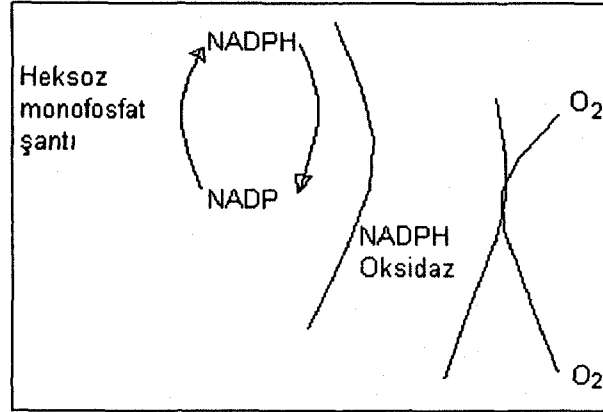
Serbest radikallerin sitotoksik etki mekanizması.

Aktive edilmiş fagosit $\rightarrow O_2 \rightarrow$ Hedef hücre \rightarrow Zar komponentlerine hasarAktive edilmiş fagosit $\rightarrow O_2 \rightarrow$ eritrosit \rightarrow Hücre içinde hemoglobin ile etkileşim

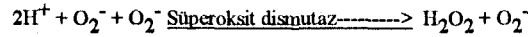
Oksijen tüketimi ve süperoksit anyonu (O_2^-) üretiminden sorumlu enzim sistemi, nikotinamid adenin dinükleotid [NAD (H), NADP (H)] oksidaz olarak tanımlanmaktadır (Tablo 4). Çeşitli araştırmacılar, O_2^- üretiminin düzenlenmesinde NADPH ve NADH 'ın intrasellüler oranının önemli etkisi olduğunu iddia etmektedirler⁽³³⁾.

Tablo - 4

Fagositik hücrelerde NADPH oksidazın, aktivasyon mekanizması.



SOD; iki değerli bakır içermekte olup, süperoksit radikalini (O_2^-) bu özelliğinden dolayı H_2O_2 'ye dönüştürebilmektedir.



Serbest radikallerin detoksifikasyonu için peroksitlerin elimine edilmesi gereklidir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, detoksifikasyonda işlevi olan belli başlı iki enzimdir⁽⁷⁾.

Katalaz enziminin H_2O_2 'ye ilgisinin az olması nedeni ile glutatyon peroksidaz daha önemli bir işleve sahiptir. Bundan da anlaşıldığı gibi süperoksit dismutaz ile peroksitlere dönüşen serbest radikallerin elimine edilebilmesi için glutatyon peroksidaz enzimine ihtiyaç vardır ki bu da ortamda redükte glutatyon (GSH) varlığında etkilidir. Glutatyon peroksidaz enziminin üç önemli görevi vardır⁽⁷⁴⁾:

- Hidrojen peroksitleri suya çevirir.
- Peroksida yağ asitlerini hidroksil yağ asitlerine çevirir.
- Proteindeki sülfidril gruplarını okside eder.

Vitamin E ve B-karoten antioksidan etkiye sahip olan bileşiklerdir. Vitamin E ve B-karoten'in serbest radikallerin etkilerine karşı dokuları korudukları rapor edilmiştir⁽⁶⁴⁾.

ATP-az SİSTEMİ

Adenozin-5-Trifosfaz enzimi ($Na^+ - K^+ / Mg^{++}$ ATP ase) sodyum ve potasyum tarafından uyarılır, aktivasyon için magnezyuma gerek duyar. Egelhardt ve Iyubimova 1939 yılında miyozinde ATP 'yi hidroliz eden ATP-az aktivitesini gösterdikten sonra, kasın kasılmasıyla bu enzimin ilişkisi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Skou ve arkadaşları 1941 yılında kas zarlarında yaptıkları çalışmalarla hücre dışı ve hücre içi konsantrasyon farkının bir pompa tarafından düzenlendiği şeklindeki görüşlerini deneysel olarak göstermişlerdir^(40,74,79).

Flynn ve Maizel 1949 yılında K^+ 'un hücre zarından içeri girişinin, içteki Na^+ konsantrasyonunun düşük olduğunda azaldığını, Na^+ 'un dışarı çıkışının ise dıştaki K^+ konsantrasyonunun düşük olduğunda azaldığını göstermişlerdir⁽⁴⁰⁾.

Hodgkin ve Huxley 1952 'de kasılmalar sırasında Na^+ 'un sinir hücresi dışındaki iyon konsantrasyonu durumuna göre yer değiştirdiğini ve bu işlemin ATP hidrolizi ile paralel gittiğini göstermiştir^(78,79,80,81).

Hidrolize olan her bir mol ATP başına üç mol Na^+ 'un hücre dışına atıldığı yapılan ölçümlerde gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerden dışarı atılan her 3 mol Na^+ 'a karşılık 2 mol K^+ 'unda içeri taşındığı bilinmektedir. Na^+ ve K^+ iyonlarının fosforilasyon ve defosforilasyon şeklindeki dögüsel bir değişim ile hücre içi ve dışı arasında taşındığı bugün için kabul edilen görüştür⁽⁸¹⁾. Magnezyum; enzim-substrat kompleksinin bir parçasıdır. ATP-az enzimi maksimum aktivasyonunu ATP ve magnezyum iyonu miktarı 3mM olduğu ortamda gösterir⁽⁷⁹⁾.

Enzim aktivitesi kalsiyum iyonu için 0.38 mM, magnezyum için 0.5 mM olarak belirlenmiştir⁽⁸¹⁾. Zar'a bağımlı bir çok amin gibi taşıma işleminden sorumlu ATP-az enzimlerinde aktivasyon için fosfolipidlerin varlığına gereksinim duymaktadırlar⁽⁷⁹⁾.

Magnezyum Tarafından Uyarılan Adenozin-5'-Trifosfataz Mg^{++} ATP-az

Magnezyum iyonunun transportundan sorumlu olan Mg^{++} ATP-az enzimi hakkındaki klasik bilgilerimiz bu gün için yeterli değildir. Şeker ve fosfatların taşınmasından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Yalnız nörotransmitterlerin taşınmasından sorumlu olduğu kesinlik kazanmış gibidir⁽³⁵⁾.

Kalsiyum Tarafından Uyarılan Adenozin-5'-Trifosfataz Ca^{++} ATP-az

Daha çok sarkoplazmik retikulumda çalışılan bu enzim kalsiyum iyonlarının taşınmasından sorumludur^(32,68). Kas hücrelerinin sarkoplazmik retikulumundan başka sarkolemma ve eritrosit zarında, trombositlerde, beyin mikrozomlarında, plasenta, sinir hücresi, böbrek tübüler hücreleri ve salgı bezlerinde $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ ATP-az enziminin varlığı gösterilmiştir. Etki mekanizmasında ATP 'nin $\text{Ca}^{++} / \text{Mg}^{++}$ ATP-az'a bağlanmada magnezyum iyonuna gereksinim duyması; bu enzimin $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{++}$ ATPaz'dan ayırt edici özelliğidir⁽⁶⁹⁾.

MATERYAL METOD

Cerrahi Prosedür ve İmplantasyon

Bu araştırma dört grupta yürütüldü. Her iki cinsten, ağırlıkları 15-20 kg arasında olan 35 domestik domuz kullanıldı. Birinci grup 5, 2., 3. ve 4. grup 10 'ar denekten oluşturuldu. Denekler operasyon öncesi eşit ve dengeli şekilde beslendiler ve operasyondan 12 saat öncesinde aç bırakıldılar. Denekler 2 mg/kg xylazin İM (Rompun, Bayer İlaç San, İST.) ve 12,5 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Parke-Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç San, İST.) verilerek genel anestezi ile uyutulduktan sonra skalp'e subkutanöz % 1 'lik lidokain verilerek lokal anestezi ile desteklendi. Skalp traş edilip temizlendikten sonra battikon ile sterilize edildi, insizyon yeri işaretlendi ve steril çamaşırlar örtüldü. Koroner sütür üzerinde, sagittal sütürü çaprazlayan, açıklığı posteriora bakan, yarım ay şeklinde 5 cm uzunluğunda insizyon yapıldı. Periost sıyrıldı, koroner sütüre 1cm anterior, sagittal sütüre 1 cm lateral lokalizasyonda olmak üzere bilateral 1cm çapında burr-hole açıldı, dura mater'in zedelenmemesine dikkat edildi. Daha sonra dura haç(+) şeklinde açıldı, dura açılırken korteksin zedelenmemesine dikkat edildi. Avasküler kortikal bir lokalizasyon belirlendi ve kortikal yüzeyden 2 mm derinliğe frontal lob içine gruplara uygun olarak salin, kollagen, interlökin ve heparin implantasyonu yapıldı(Tablo-5). İmplantasyon yapıldıktan sonra dura mater sütüre edildi. Reflüyü önlemek için burr-hole bone-wax (Ethicon, Peterborough, Ontario) ile onarıldı. Skalp ciltaltı ve cilt sütüre edilerek kapatıldı. Tüm prosedür aseptik olarak uygulandı. Denekler anesteziden uyandıktan sonra muayene edildi, hiçbirinde nörolojik defisit yada verilen maddeye karşı reaksiyon gözlenmedi. İlk Uygulama sonrasında bir deneğin CT'si alındı(Resim1-2). Deneklerin herbiri beslenme durumu, bilinç seviyesi ve motor aktivite için günlük olarak muayene edildi. Profilaktif amaçla peri ve post operatif olarak 3 kez 100 mg/kg seftriakson verildi. Deneklerde enfeksiyon gözlenmedi.

Tablo-5

Deneklere Uygulanan Maddelerin Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	n	A (Sağ)	B (Sol)
1	5	Salin	Heparin
2	10	Kollagen	Kollagen+Heparin
3	10	İnterlökin	İnterlökin+Heparin
4	10	İnterlökin+Kollagen	İnterlökin+Kollagen+Heparin

Eksperimental Protokol

Grup 1 (Kontrol Grup): Yukarıda belirtilen şekilde cerrahi prosedür uygulandı. İnjesiyondan dolayı travma ve kan-beyin bariyerinin bozulmasının sonucu meydana gelen lezyonun kontrolü olarak sağ frontal lob içine 0,5 cc salin, sol frontal lob içine 2500 İÜ/1cc heparin (Nevparin-Mustafa Nevzat İlaç Sanayi, İST) injekte edildi.

Grup 2: Yukarıda belirtilen şekilde cerrahi prosedür uygulandı. Sağ frontal lob içine serum fizyolojik absorbe edilmiş olan 10 mg/0,5cc kollajen-fibril(Native, reine Kollagenfibrillen. Pharmazeutischer Unternehmer/Officina di produzione. B.Braun Melsungen AG D-3508 Melsungen Germany) implante edildi. Sol frontal lob içine 2500 İÜ heparin absorbe edilmiş olan 10 mg/1cc kollajen-fibril implante edildi.

Grup 3: Yukarıda belirtilen şekilde cerrahi prosedür uygulandı. Sağ frontal lob içine 640 pikogram/0,5cc interlekin-1 α , sol frontal lob içine 640 pikogram/0,5cc interlekin-1 α + 2500 İÜ heparin /0,5cc injekte edildi.

Grup 4: Yukarıda belirtilen şekilde cerrahi prosedür uygulandı. Sağ frontal lob içine 640 pikogram interlekin-1 α absorbe edilen 10 mg/0,5cc kollajen-fibril implante edildi. Sol parietal lob içine 640 pikogram interlekin-1 α absorbe edilen 10 mg/0,5cc kollajen-fibril + 2500 İÜ heparin /0,5cc implante edildi.

Uygulamadan 1 ay sonra tüm denekler aşırı doz tiopental sodyum (Pental Sodyum, İ.E. Ulagay İlaç Sanayi T.A.Ş, İST.) ile uyutuldu ve eksangüasyon ile öldürüldüler. Geniş bir kraniektomi sonrasında serebrumları çıkartıldı(Resim-3). Gruplara uygun olarak lezyon bölgesinden çevresindeki normal doku ile birlikte 0,3 x 0,3 x 0,3 cm'lik üç blok halinde biyopsiler alındı. Bu bloklar, ışık mikroskopisi, elektron mikroskopisi ve enzim değişikliklerini değerlendirmek için çalışıldı.

Işık Mikroskopisi Çalışmaları

Cerrahi spesmenler %10 fosfat buffer formalinde tespit edildi. Rutin takip işlemi uygulandı. Parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere Hematoksilin-Eozin (H-E), retikulin, Periodic Acid Schiff (Pas) boyaları yanı sıra ABC immünperoksidaz yöntemiyle Factor VIII / RA (Related Antigen) (Katalog no:DPC,CKF 8S Los Angeles CA) uygulandı. Kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Reichertz marka mikroskopta 21 DM/100 ASA filmle fotoğrafları çekildi.

Çeşitli tümörlerde anjiogenesi değerlendirmede kullanılan MAGS (microscopic angiogenesis grading system) skalasının vasoproliferatif komponenti kullanılarak anjiogenesis histolojik olarak skorlandı. Mikrodamarlar mikroskopta 200 büyütmede sayıldı. Bu büyütmede muayene edilen alan 2,54 mm²'yi kapsıyordu. Histolojik slaytlar ilkönce düşük büyütmede incelendi, daha sonra analiz için vasküler yoğunluğun maksimal olduğu bir alan seçildi. Bu alan genellikle implantasyon alanına perifer lokalizasyondaydı. Endotelial hücrelerle döşeli her bir lumen tek bir kan damarı olarak sayıldı. Hernekadar kıvrımlı bir damarın aynı alanda yeniden görülme olasılığı olsada, her bir kesintisiz vasküler lumen ayrı bir damar olarak sayıldı⁽⁹⁷⁾.

Elektron Mikroskopisi Çalışmaları

Elektron mikroskopu için alınan doku parçaları hemen Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5 lik gluteraldehit solusyonu içerisine kondu.Bu solusyonda +4 °C'de dört saat süreyle tesbit edilen doku parçaları daha sonra Millonig fosfat tamponu ile çalkalandı, bir gece bu solusyonda yıkandı. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik OsO₄ solusyonu ile 2-3 saat ikinci kez tesbit edildi. Daha sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi ve araldite içerisine gömüldü⁽⁶⁰⁾. Elde edilen bloklardan ultramikrotomla 500 A° kalınlığında alınan kesitler uranil asetat ve sitrat ile boyandıktan sonra elektron mikroskopunda (ZEISS EM 900) incelendi.

Süperoksit Dismutaz Analizleri

Süperoksit dismutaz tayini için doku örneğinden bir miktar alınıp üzerine % 0,9 serum fizyolojik döküldükten sonra homojenize edildi. Doku homojenaliından 0,5 ml alıp bir tüpe kondu. Üzerine 3,5 ml distile su eklenip iyice çalkalandıktan sonra 1ml etilalkol ilave edildi. Daha sonra tekrar üzerine 0,6 ml kloroform eklendi. Şiddetli bir şekilde çalkalanıp üst fazı alınarak üzerine işlem yapıldı. İşlem sonrası volüme karşı absorbens değerleri okunup % 50 inhibisyon dikkate alınarak Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı⁽⁷²⁾. Süperoksit dismutaz enzim sistemine ait sonuçlar Ü/mg prot. olarak ifade edilmiştir.

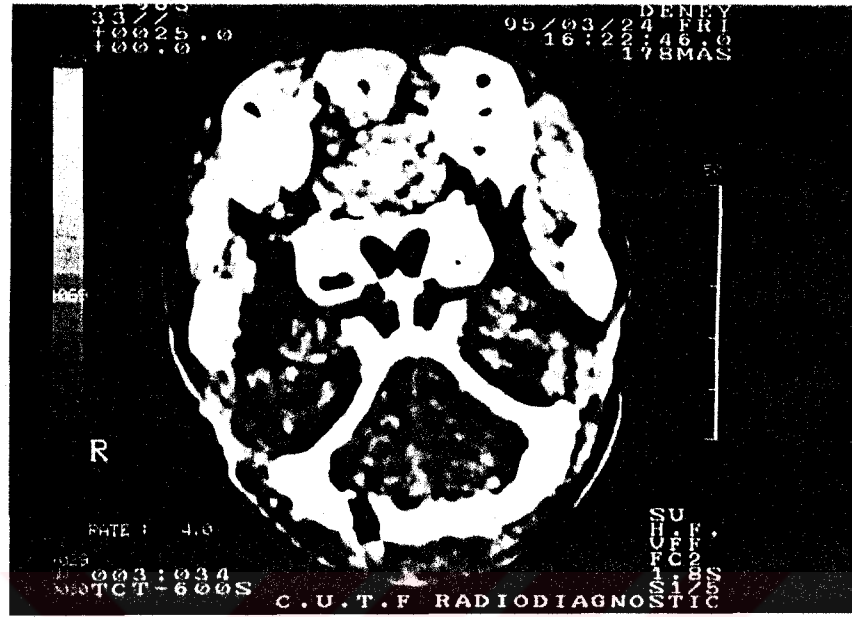
ATP-az Analiz Çalışmaları

ATP-az tayini için doku örneğinden bir miktar alınıp, %10 konsantrasyonluk porsiyonlar halinde, 0,40mm olan teflon pistonlar yardımı ile 100 xg'de homojenize edilmişlerdir. Homojenizasyon işlemleri soğukta yapılmıştır. Homojenatlar 1000 xg'de 15 dakika santrifüj edilerek içerdikleri kirlilikler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen berrak süzöntü Adenozin-5-Trifosfotaz (ATP-az) enzim sistemine ait spesifik aktivite ölçülmesinde kullanılmıştır. ATP-az aktivitesi enkübasyon sırasında ortama eklenen 3mm disodyum (ATP) varlığında her mg protein için bir saatte açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır^(68,69).

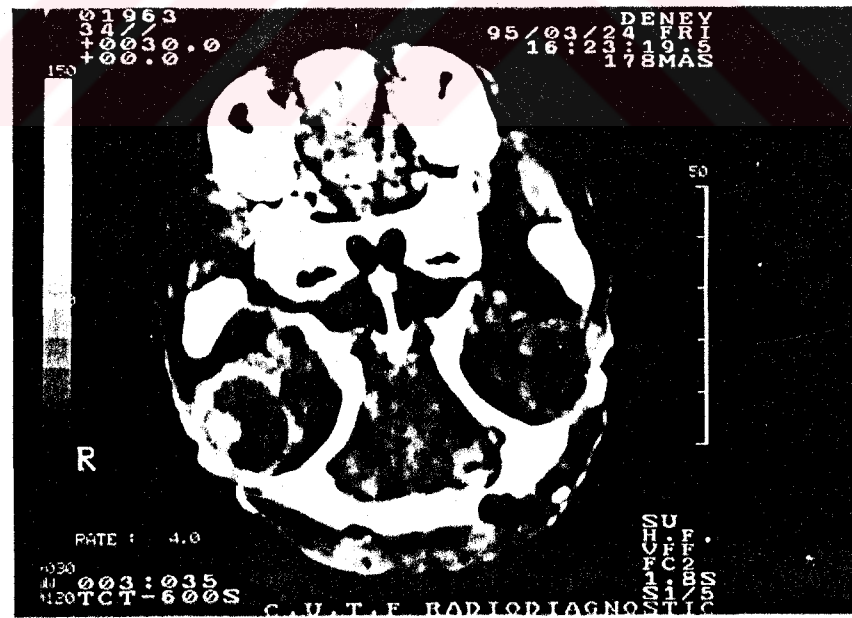
İnkübasyon ortamına eklenen Adenozin Trifosfat'dan (ATP) açığa çıkan inorganik fosfat ölçümü Atkinson tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. ATP'den ayrılan inorganik fosfatın Cirrasol ALIV-WF (Lubrol) ve fosfomolibdat ile kompleks kurması ilkesine dayanmaktadır. Sonuçların değerlendirilmesinde örneklerin 390 nm dalga boyunda göstermiş oldukarı absorbens değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafikleri kullanılmıştır. Protein tayini örneklerin içerdiği total miktarlar Lowry ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle göre saptanmıştır⁽⁸⁾.

Değerlendirme , örneklerin içerdiği protein miktarları standart çözeltilerin gösterdikleri absorbens değerleri ile karşılaştırılarak saptandı ve istatistiksel metotlarla değerlendirildi.

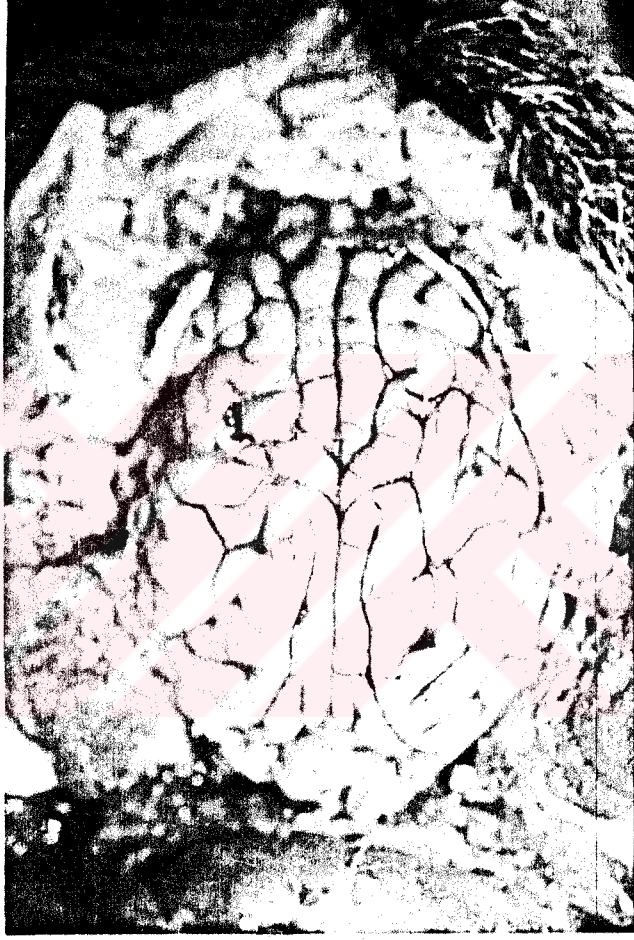
Adenozin-5-Trifosfataz (ATP-az) enzim sistemine ait sonuçlar nMol Pi/mg protein/saat cinsinden ifade edilmiştir.



Resim-1. İmplantasyon yapıldıktan sonra BBT görünümü.



Resim-2. İmplantasyondan yapıldıktan sonra BBT görünümünden diğer bir kesit.



Resim-3. İmplantasyon yapılan deneğin bir ay sonra çıkartılan serebrumunun görünümü.

BULGULAR

Işık Mikroskopisi Bulguları

Grup 1-A: Kontrol grubuna ait beyin biyopsilerinden hazırlanan kesitlerde makrofaj toplulukları, az sayıda lenfosit, eozinofil-lökosit infiltrasyonu yanı sıra ekstrasvaze eritrositler, vasküler yapılar izlendi (Resim 4). Faktör VIII / RA ile damar luminal yüzeyinde pozitif boyanma saptanmıştır. Damar Endotellerinde boyanma görülmemiştir (Resim 5).

Grup 1-B: Beyin biyopsilerinden hazırlanan kesitlerde vaskülarizasyon normal görünümdeydi.

Grup 2-A: İmplantasyon alanında makrofaj toplulukları, vasküler proliferasyon görüldü. İmplantasyon alanına komşu beyin dokusunda reaktif gliozis, spongiozis, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vasküler proliferasyon mevcuttu (Resim 6).

Grup 2-B: İmplantasyon alanında makrofaj toplulukları, lenfosit infiltrasyonu, ekstrasvaze eritrositler, vasküler proliferasyon görüldü. İmplantasyon bölgesinden proliferen vasküler yapıların çevre dokuya ilerlediği dikkati çekti. İmplantasyon bölgesine komşu beyin dokusunda spongiozis ve reaktif gliozis izlendi (Resim 7).

Grup 3-A: İnjesiyon bölgesinde makrofaj toplulukları, vasküler proliferasyon, komşu beyin dokusuna ilerleyen vasküler yapılar, damar duvarlarında kalınlaşma, endotel proliferasyonu izlendi (Resim 8).

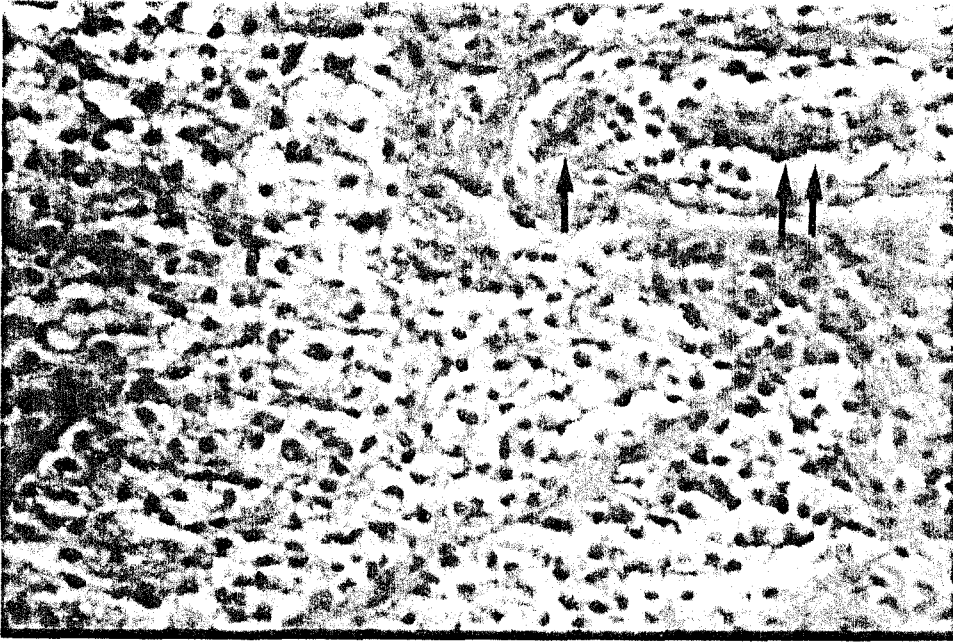
Grup 3-B: İnjesiyon bölgesinde makrofaj toplulukları, vasküler proliferasyon izlendi. Komşu parankimde spongiozis, vasküler-endotel proliferasyonu ve reaktif gliozis görüldü.

Grup 4-A: İmplantasyon alanında makrofaj toplulukları, lenfosit ve plazma hücreleri, çevre beyin dokusunda vasküler proliferasyon, endotel proliferasyonu, reaktif gliozis izlendi (Resim 9).

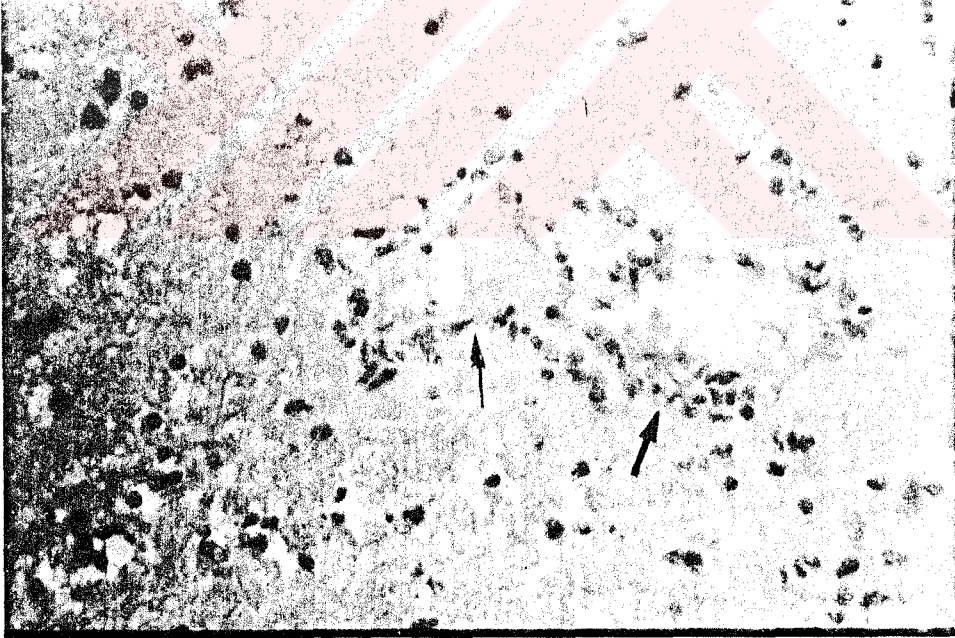
Grup 4-B: İmplantasyon alanında mononükleer hücreler, hemosiderinle yüklü makrofajlar ve vasküler proliferasyon görüldü. Çevre dokuda vasküler ve endotel proliferasyonu, reaktif gliozis izlendi. İmplantasyon bölgesinden mononükleer hücre infiltrasyonunun ve vasküler proliferasyonun komşu dokuya ilerlediği dikkati çekti (Resim 10).

İmmunohistokimya: Tüm gruplara ait seçilen örneklere ABC immünperoksidaz yöntemi ile damarların luminal yüzeyinde pozitif boyanma görülmüş, endotelde boyanma saptanmamıştır.

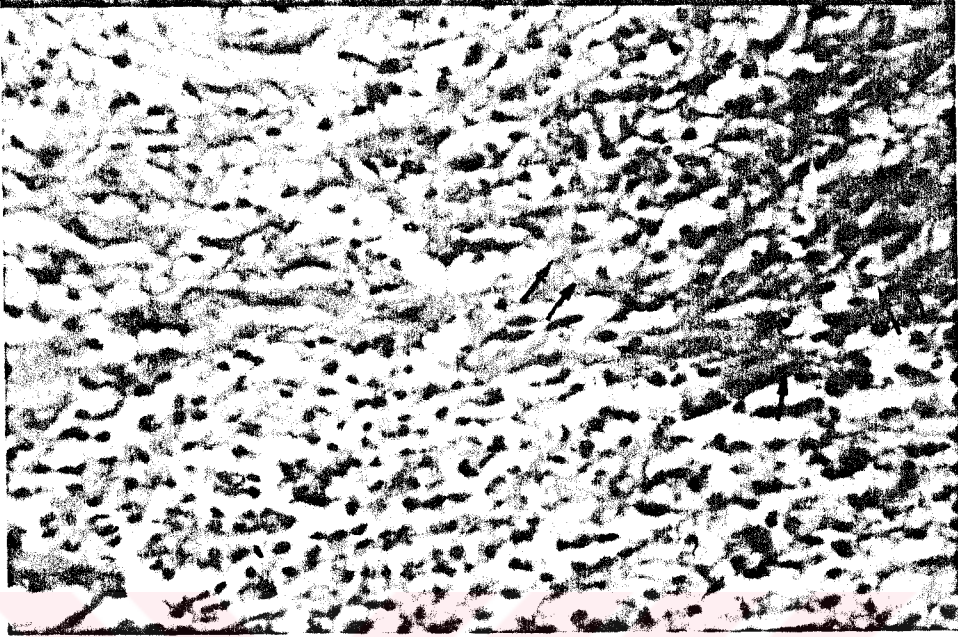
MAGS 'ne göre hesaplanan grupların vasküler yoğunluk ortalama değerleri tablo-15 ve grafik-2 de gösterilmiştir. Tablo 16 'da Mann-Whitney U testine göre grupların vasküler yoğunluk ortalama değerlerinin istatistik sonuçları verilmiştir.



Resim-4. Lezyon alanında makrofaj toplulukları ve vasküler proliferasyon. H.E x 600.

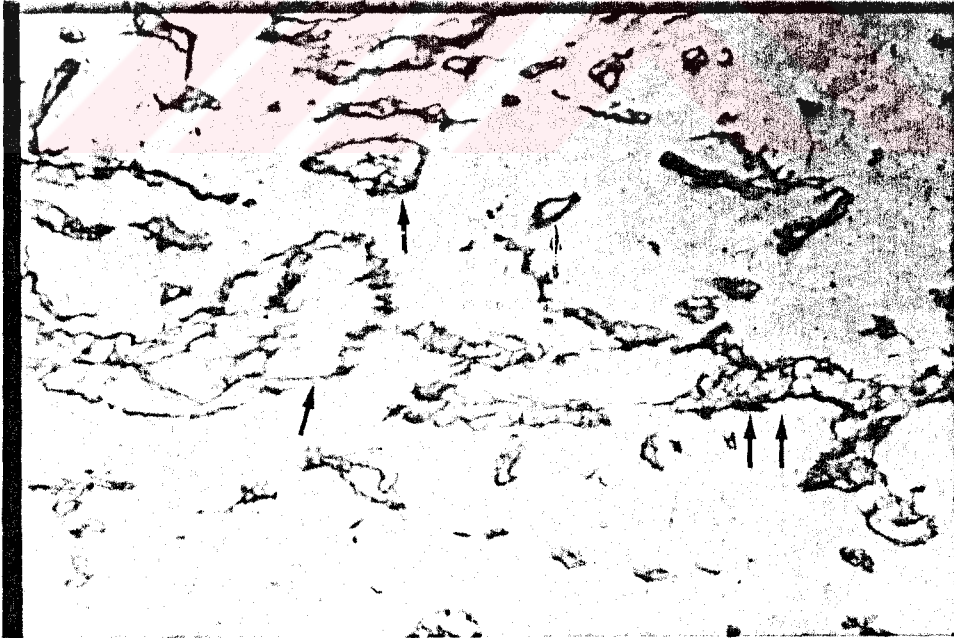


Resim-5. Damar luminal yüzeyinde F. VIII/RA ile pozitif boyanma . ABC x 600.

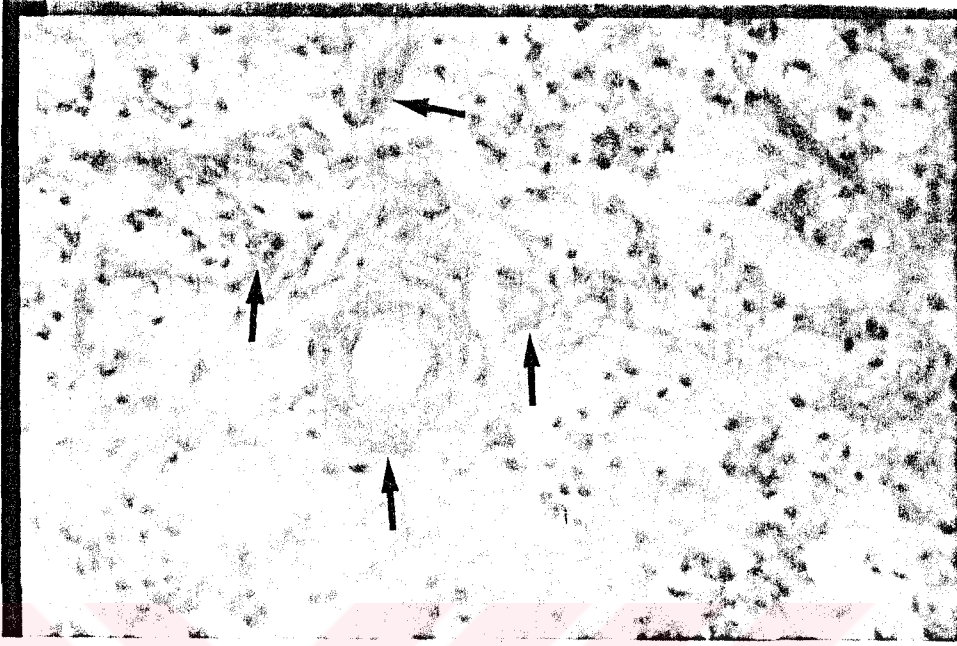


Resim-6. Lezyon alanında makrofaj toplulukları ve çevre dokuya ilerleyen proliferatif vasküler yapılar.

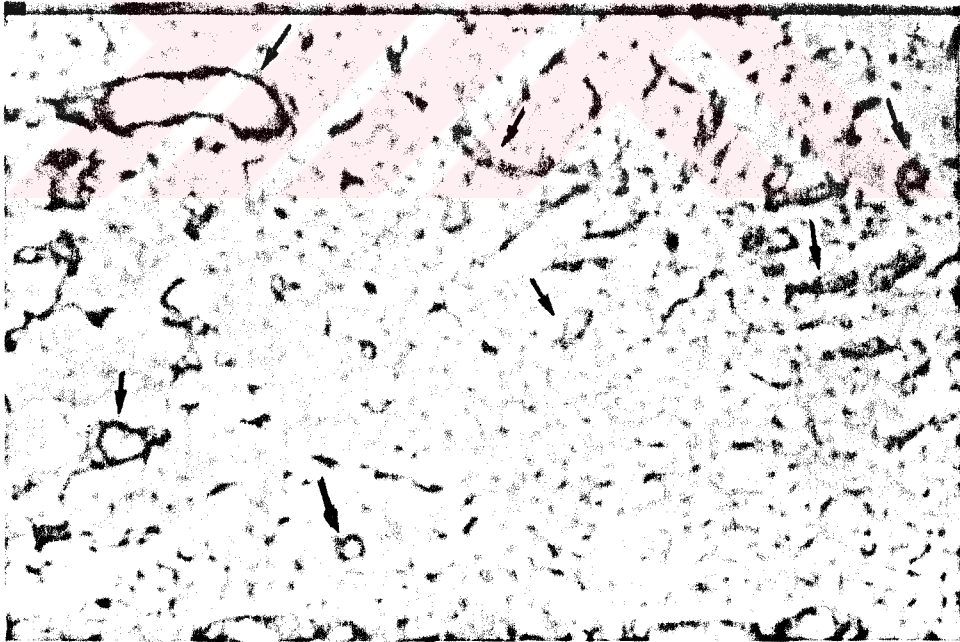
H.E x 600.



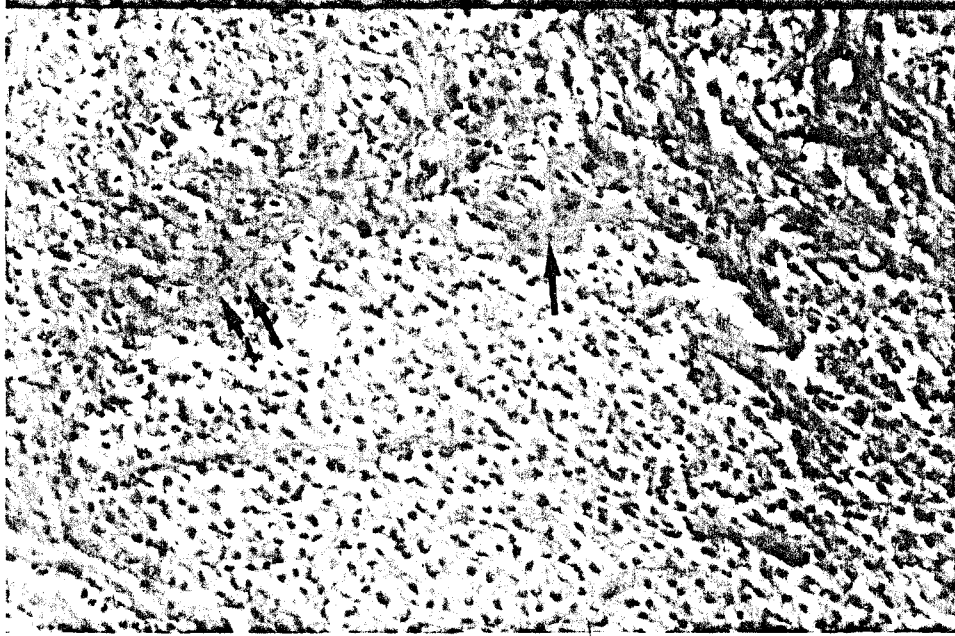
Resim-7. Lezyon alanında ve çevre beyin dokusunda ilerleyen vasküler yapılar. Retikulin x 375.



Resim-8. Lezyon alanında vasküler yapılar. H.E x 600.



Resim-9. Lezyon ve lezyona komşu beyin dokusunda vasküler yapılar. Retikulin x 375.



Resim-10. Lezyon alanında çevre beyin dokusuna ilerleyen vasküler yapılar. H.E x 375.

Elektron Mikroskopisi Bulguları

Grup 1-A: Serum fizyolojik verilmiş tamamen kontrol grubuna ait beyin biyopsilerinin incelemesinde; kortekste sinir hücreleri, glia hücreleri, sinir lifleri ve kan damarlarının normal yapılarını korudukları saptandı (Resim-11). Kapiller damarlar endotel ile döşeliydi ve endotel hücreleri arasında sıkı bağlantıların varlığı görüldü. Endotel hücreleri dıştan bir bazal lamina ile sarılı idi. Bazal lamina aynı zamanda perisitleri de sarmıştı. Sinir lifleri normal yapıdaydı (Resim-12).

Grup 1-B: Parankimal hücreler ve kapillerlerin ince yapısı grup 1A 'ya benzemektedir.

Grup 2-A: Beyin korteksinde sinir hücreleri genellikle normal görünümdeydi. Sitoplazmalarında organeller normal yapılarını korumuştular. Bununla beraber bazı sinir hücrelerinde mitokondriyonlarda hafif genişlemeler ve lipofuksin granüllerinde artışlar izlendi (Resim-13). Glia hücreleri ve sinir lifleri de normal yapıdaydı. Kapillerler endotel hücreleri ile döşeliydi. Endotel hücreleri arasında fasia okludens tipi sıkı bağlantılar görülmekteydi. Endotel hücreleri çekirdek ve sitoplazmik organelleri yönünden normal yapılarını korumuşlardı. Oldukça belirgin olarak izlenen bazal lamina perisitleri de sarmıştı. Perikapiller alanlarda astrosit ayaklarında hafif genişlemeler olmakla birlikte genellikle normal yapı korunmuştu (Resim-13-14).

Grup 2-B: Parankimal değişiklikler grup 2-A 'ya benzemektedir. Ancak, kapillerler etrafında astrosit ayaklarında genişlemeler oldukça belirgindi. Kapiller endotel hücreleri normal yapılarını korumuştular. Kapillerler belirgin bir bazal lamina ile sarılı olarak izlendiler (Resim-15).

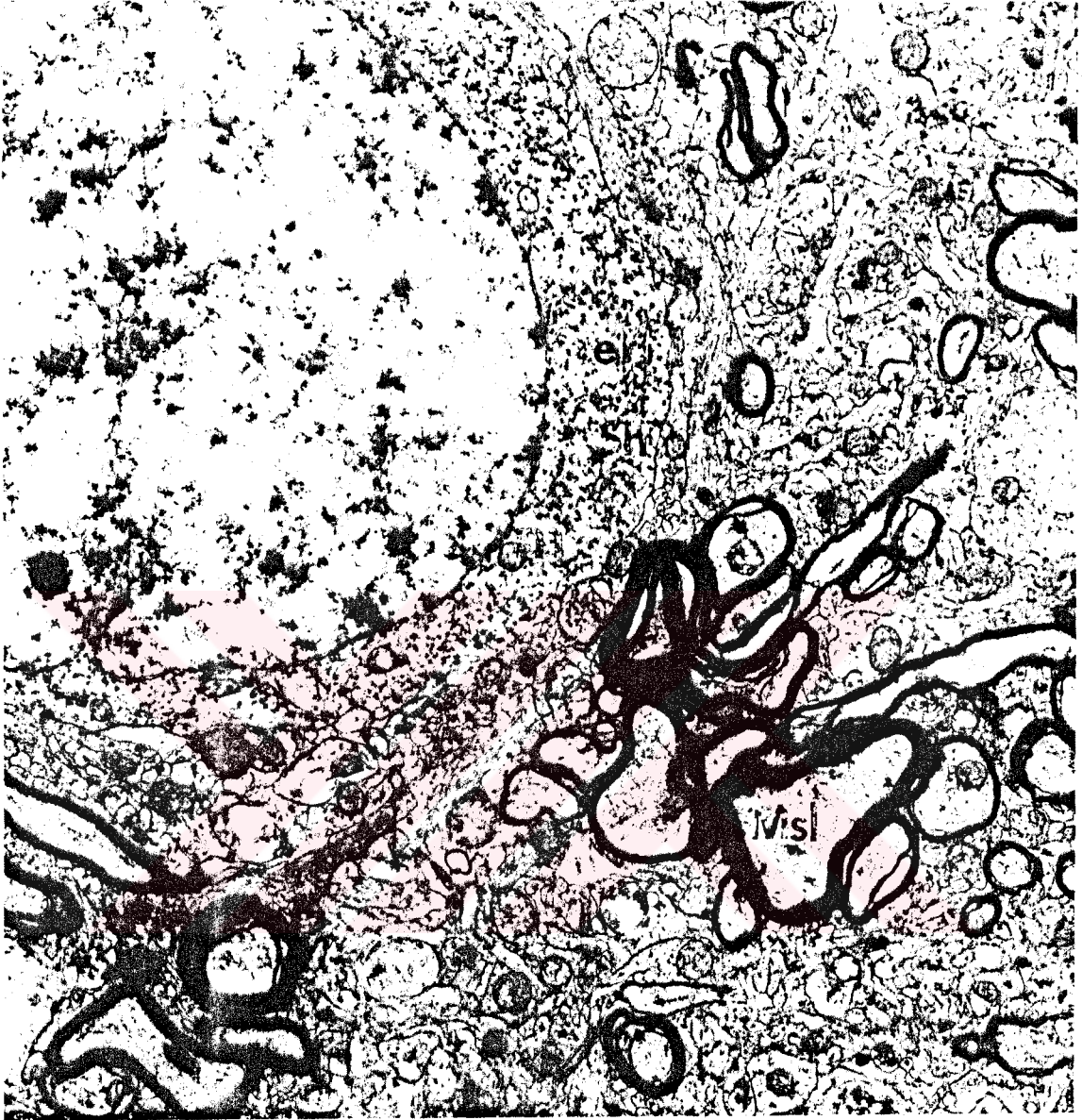
Grup 3-A: Beyin korteksinde sinir hücrelerinin çekirdeklerinde heterokromatin artışı, sitoplazmada granüler endoplazmik retikülüm ve mitokondriyonlarda genişleme, mitokondriyon kristallerinde parçalanmalar izlendi. Sinir hücrelerinin sitoplazmaları oldukça elektron dens ve vakuoler bir görünümdeydi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfda hafif parçalanmalar ve miyelin

kılıfın akson içerisine doğru yapmış olduğu invaginasyonlar gözlemlendi. Ayrıca, parankimada ödem alanlarını simgeleyen interstisyel boşluklara sıklıkla rastlandı (Resim-16). Kapillerler genellikle endotel hücreleri ve bazal laminaları ile birlikte normal yapıda izlendi.

Grup 3-B: Sinir hücrelerinin çekirdeklerinde heterokromatin artışları, sitoplazmalarında ise mitokondriyonlarda ve granüler endoplazmik retikülümde hafif genişlemeler gözlemlendi. Glia hücreleri genellikle çekirdek ve sitoplazmik özellikleri yönünden normal olarak izlendi. Parankimada yer alan kapillerlerde endotel hücreleri gelişmişti. Ancak, aralardaki sıkı bağlantılar belirgin değildi. Kapiller bazal laminası oldukça ince olarak izlendi. Ayrıca, özellikle perikapiller alanlarda belirgin olmak üzere ödem alanlarını simgeleyen boşluklara rastlandı (Resim-17).

Grup 4-A: Sinir hücrelerinin çekirdeklerinde kromatin dağılımı normaldi. Bununla beraber sitoplazmalarında mitokondrial değişiklikler belirgindi. Mitokondriyonlar genişlemiş ve vakuoler bir görünüm almışlardı. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıflar genellikle normaldi (Resim-18). Kapillerler, endotel hücreleri ile dōşeliydi ve hücreler arasında sıkı bağlantılar görölmekteydi. Kapiller bazal laminası oldukça inceydi ve laminasyona sahipti. Perikapiller alanlarda ödem değişiklikleri ve miyelin kılıf harabiyeti ile birlikte yapısal değişikliklerin varlığında dikkati çekti (Resim-19).

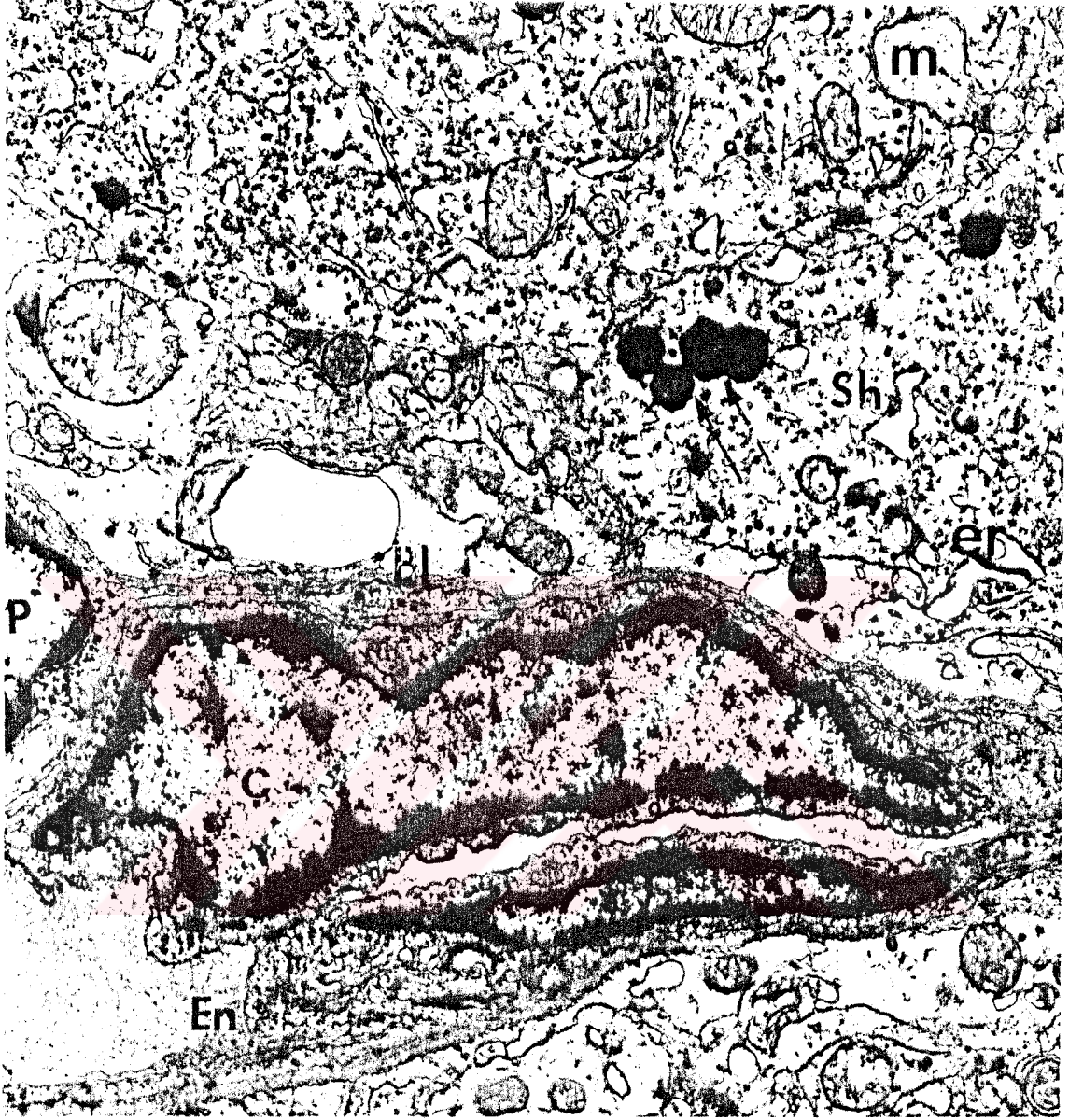
Grup 4-B: Parankimal değişiklikler grup 4-A 'ya benzemekteydi. Kapiller endotel hücreleri çekirdek ve sitoplazmik organelleri yönünden normal yapılarını korumaktaydı. Endotel hücreleri arasında bağlantı kompleksleri izlendi. Endotel hücrelerini dıştan saran bazal lamina belirgin olarak görölmekteydi. Kapillerler etrafında astrosit ayaklarında aşırı genişlemeler gözlemlendi. Bu yapılarda organel harabiyetlerini simgeleyen membranöz yapılara rastlandı (Resim-20).



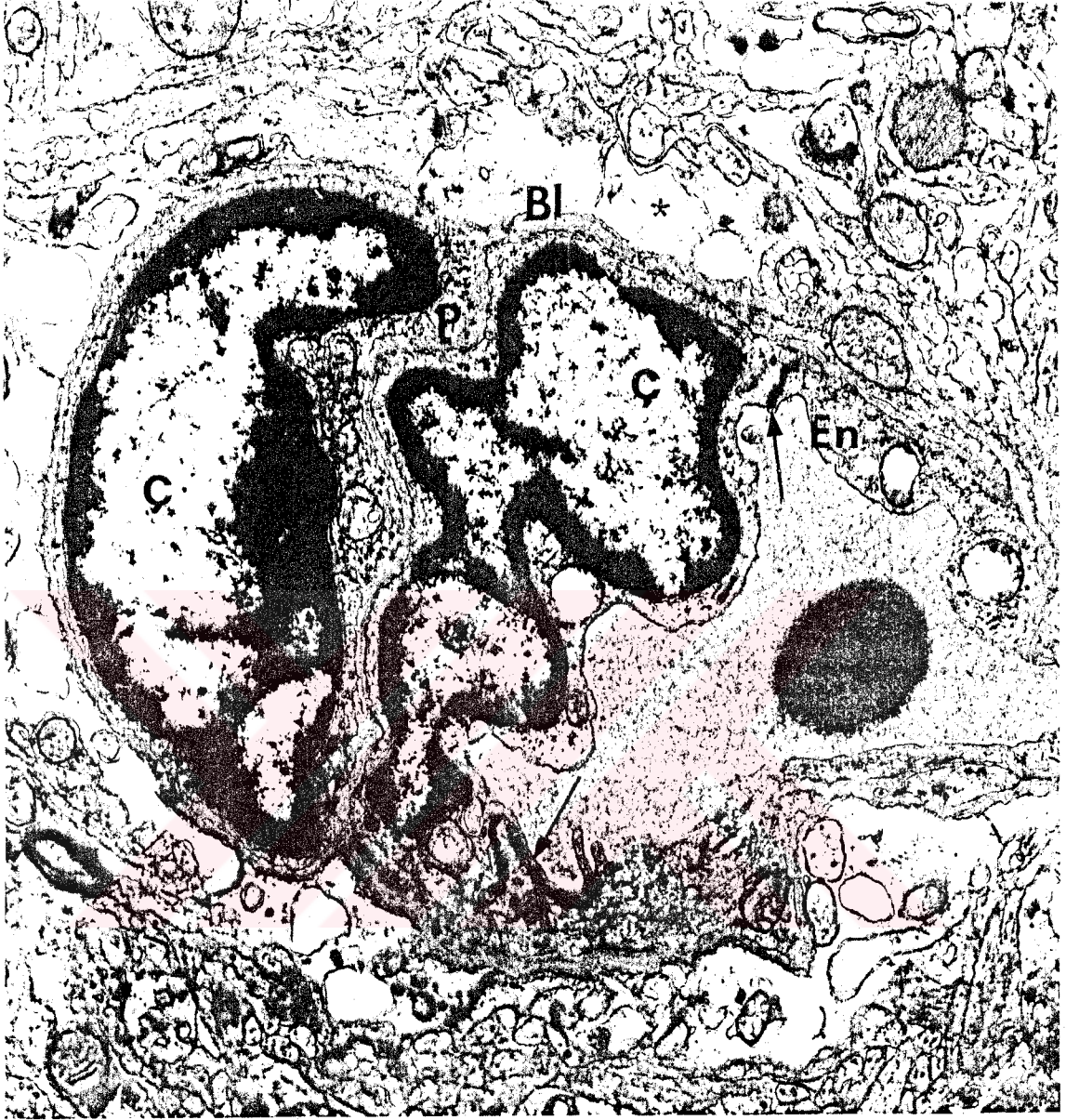
Resim 11: Sinir hücresi (Sh) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organelleri yönünden normal yapıda izlenmektedir. Miyelinli sinir lifleri (Msl), endoplazmik retikülüm (er), mitokondriyon (m). X 9800.



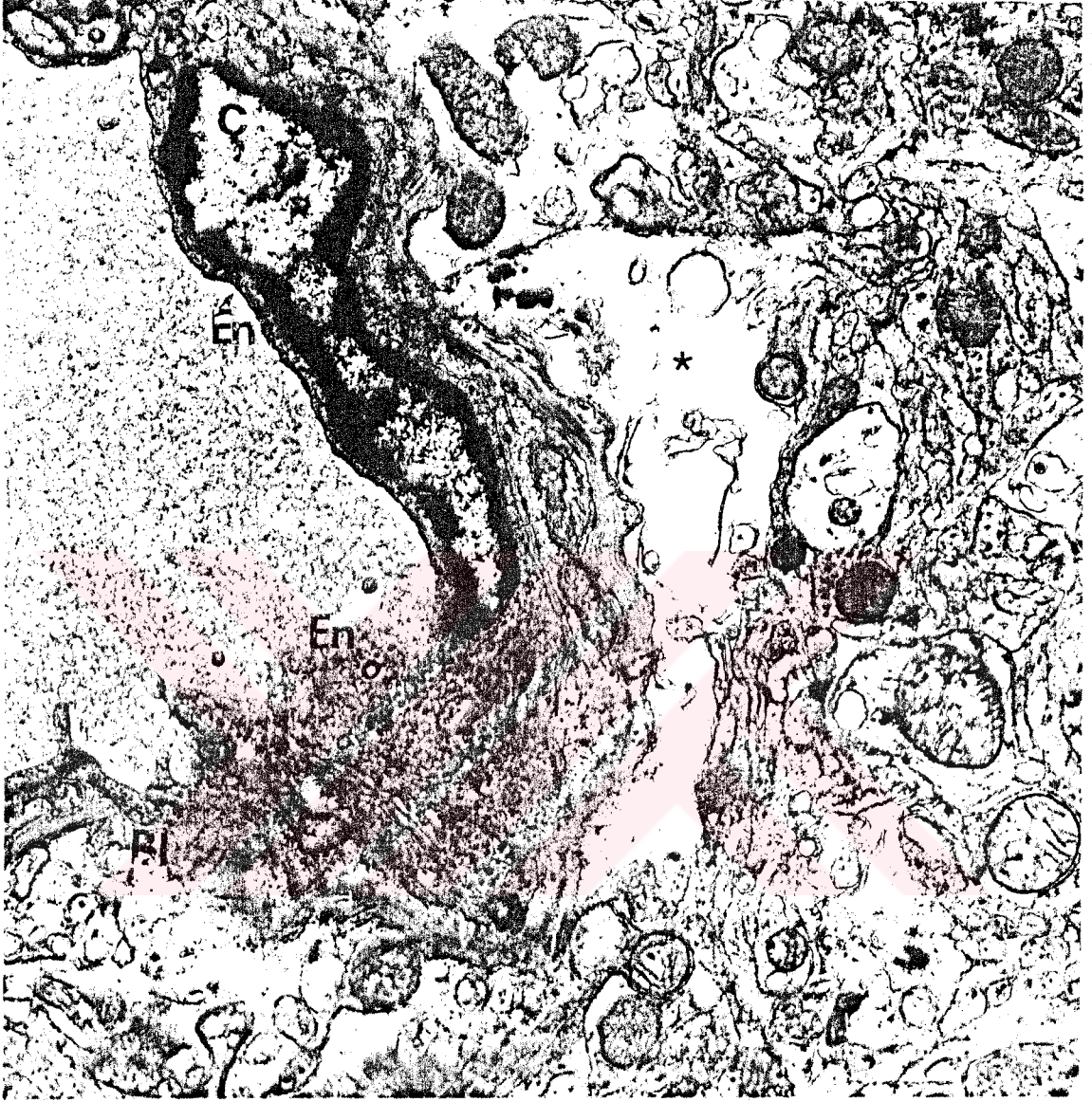
Resim 12: Sinir hücreleri (Sh) ve glia hücreleri (gh) normal yapıda izlenmektedir. Kapiller endotel hücreleri (En) arasında bağlantılar görülmektedir (oklar). Çekirdek (Ç), bazal lamina (Bl), miyelinli sinir lifleri (Msl). X 9800.



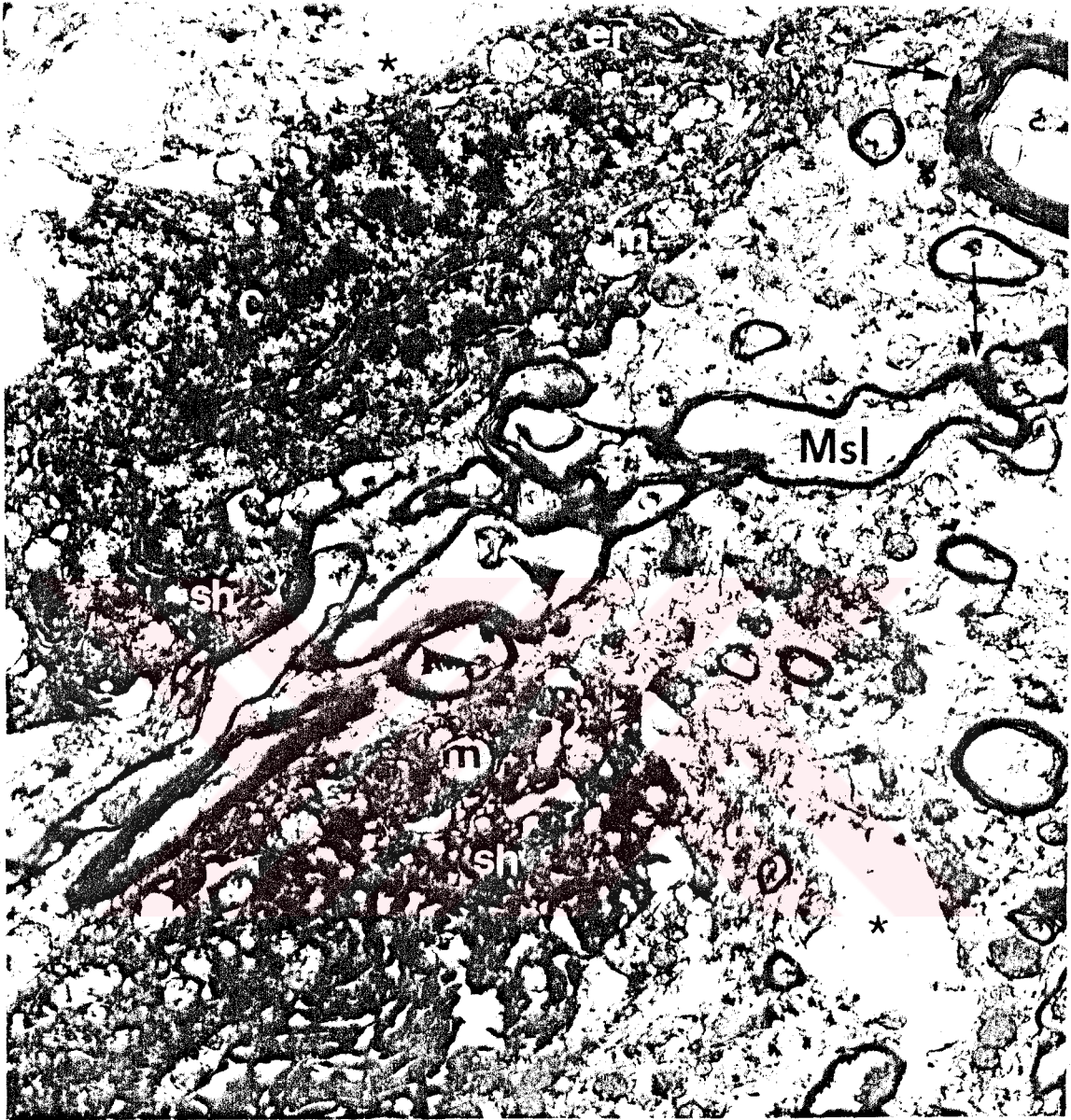
Resim 13: Sinir hücresi (Sh) sitoplazmasında mitokondriyonlarda (m) ve endoplazmik retikülümde (er) hafif genişleme ve lipofuksin granülleri görülmektedir (oklar). Kapiller endotel hücreleri (En) ve bazal lamina (Bl) normal yapıda görülmektedir. Perisit (P), çekirdek (Ç). X 15750.



Resim 14: Kapiller endotel hücreleri (En) arasında bağlantılar izlenmektedir (oklar). Bazal lamina (Bl) ve kapiller etrafında yer alan perisit (P) görülmektedir. Çekirdek (Ç), astrosit ayakları (*). X 15750.



Resim 15: Kapiller endotel hücreleri (En), çekirdek (Ç) ve sitoplazmik organelleri normal yapıda görülmektedir. Ancak perikapiller astrosit ayaklarında genişlemeler (*) izlenmektedir. Bazal lamina (Bl), X 15750.

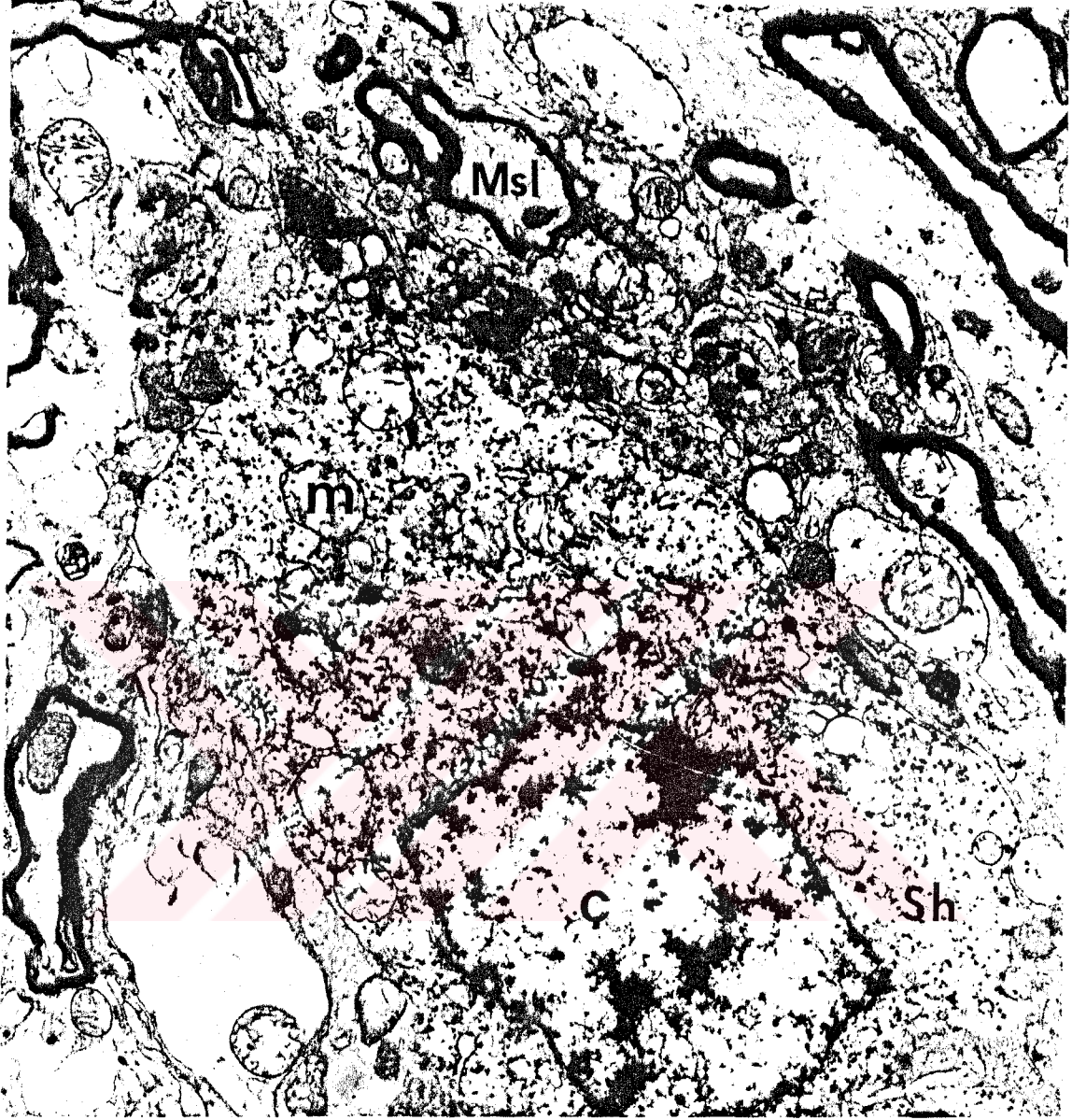


Resim 16: Sinir hücrelerinde (sh), çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) ve endoplazmik retikülümde (er) genişlemeler izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde (Msl) miyelin kılıfda hafif parçalanmalar (oklar) ve miyelin kılıfın akson içine doğru yapmış olduğu invaginasyonlar (ok başları) görülmektedir. Ayrıca parankimada ödem alanlarını simgeleyen interstisyel boşluklar (*) gözlenmektedir. X 9900.



Resim 17: Sinir hücresi (Sh) çekirdeğinde (Ç) heterokromatin artışı, sitoplazmada mitokondrionlarda (m) ve endoplazmik retikulumda (er) hafif genişlemeler görülmektedir. Kapiller endotel hücreleri (En) gelişmiş olmakla birlikte hücreler arası bağlantıların belirgin olmadığı ve bazal laminasında (Bl) ince olduğu izlenmektedir. Perikapiller alanlarda ödem alanlarını simgeleyen boşluklar (*) gözlenmektedir.

X 27000.



Resim 18: Sinir hücresi (Sh) çekirdeği (Ç) kromatin dağılımı normal olmakla birlikte sitoplazmasında mitokondriyal (m) degenerasyona bağlı vakuolizasyon izlenmektedir. Miyelinli sinir lifleri(Msl). X 9800.



Resim 19: Kapiller endotel hücreleri (En) arasında bağlantı kompleksleri görülmektedir (oklar). Kapiller bazal laminasının (Bl) ince ve laminasyona sahip olduğu görülmektedir. Perikapiller alanlarda hücresel ve lizel degenerasyon alanları ile birlikte ödem alanlarını simgeleyen geniş boşluklar (*) görülmektedir. Eritrosit (e). X 9800.



Resim 20: Endotel hücreleri (en) çekirdek (C) ve sitoplazmik organelleri ile normal yapıda izlenmektedir. Perikapiller astrosit ayaklarında (*) genişlemeler ve membranöz yapılar (oklar) görülmektedir. X 15750.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Doku örneklerinden elde edilen Na^+K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} ATP-az ve SOD aktivitesinin değerleri sırasıyla tablo 6,7,8 ve 9'da verilmiştir. Tablo 10 ve grafik-1 'de enzim sonuçları toplu olarak gösterilmiştir. Tablo 11,12,13 ve 14 'de enzim sonuçlarının Mann-Whitney U testine göre istatistik sonuçları gösterilmiştir.

Tablo-6
Na+K+ ATP-az Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	n	Değerler (nmol Pi/hr/mg prot.)	Ort. ±S. hata
1-A	5	290-290-300-305-315	300 ± 4.74
1-B	5	320-330-340-350-360	340 ± 7.07
2-A	10	250-255-255-270-270-280-280-285-290-290	272.5 ± 4.72
2-B	10	295-295-295-300-300-305-310-310-310-320	304 ± 2.66
3-A	10	225-230-230-235-235-240-240-240-260-280	241.5 ± 5.22
3-B	10	230-235-235-235-240-245-245-245-275-290	247.5 ± 6.15
4-A	10	190-190-190-195-195-200-205-210-215-220	201 ± 3.48
4-B	10	195-205-210-210-210-210-220-220-225-230	213.5 ± 3.25

Tablo-7
Mg++ ATP-az Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	n	Değerler (nmol Pi/hr/mg prot.)	Ort. ±S. hata
1-A	5	250-280-275-275-290	270 ± 6.89
1-B	5	270-280-285-300-315	290 ± 7.90
2-A	10	310-335-340-340-340-345-345-350-355-365	342.5 ± 4.54
2-B	10	340-350-355-355-360-360-360-365-365-370	358 ± 3.31
3-A	10	280-285-290-290-290-300-300-300-305-320	296 ± 3.63
3-B	10	290-290-300-310-310-310-315-315-320-330	309 ± 4.00
4-A	10	180-180-205-230-240-240-240-245-250-260	227 ± 9.04
4-B	10	190-190-215-240-245-245-250-255-260-260	235 ± 8.53

Tablo-8
Ca++ ATP-az Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	n	Değerler (nmol Pi/hr/mg prot.)	Ort. ±S. hata
1-A	5	70-80-95-100-105	90 ± 6.51
1-B	5	95-100-100-110-120	105 ± 4.47
2-A	10	60-70-75-75-80-85-85-85-90-95	80 ± 3.24
2-B	10	70-90-90-95-95-95-95-95-100-105	93 ± 2.90
3-A	10	55-55-60-60-60-60-65-70-70-75	63 ± 2.12
3-B	10	60-60-60-65-65-70-70-75-80-80	68.5 ± 2.47
4-A	10	70-80-80-80-85-85-85-90-90-90	83.5 ± 1.97
4-B	10	80-85-90-90-95-95-95-95-100-100	92.5 ± 2.00

Tablo-9
SOD Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı

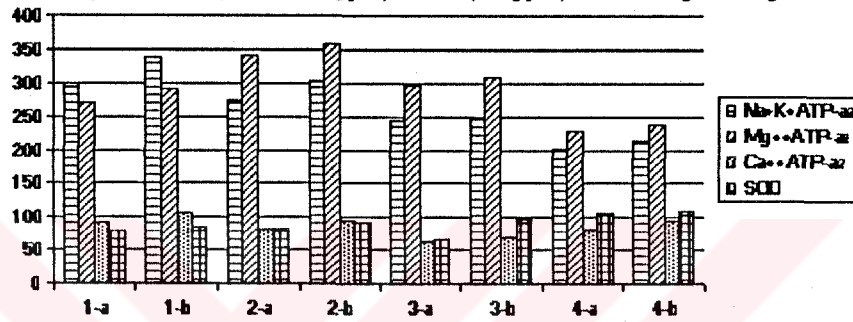
Gruplar	n	Değerler (U/mg prot)	Ort. ±S. hata
1-A	5	71-74-76-81-83	77 ± 2.21
1-B	5	80-83-84-88-90	85 ± 1.78
2-A	10	78-78-78-81-81-83-85-85-87-88	82 ± 1.00
2-B	10	84-89-89-90-92-92-92-92-93-96	90.9 ± 1.00
3-A	10	59-60-63-63-64-64-66-67-67-72	64.5 ± 1.18
3-B	10	87-90-92-96-96-98-99-100-101-104	96.5 ± 1.66
4-A	10	78-85-100-101-104-105-108-109-118-123	103.1 ± 4.28
4-B	10	93-97-103-103-105-108-115-116-120-123	108.3 ± 3.13

Tablo-10
Grupların ATP-az ve SOD ortalama Değerleri (Aritmetik Ortalama \pm standart hata)

Gruplar	n	(nmol Pi/hr/mg prot.)			(U/mg prot.)
		Na ⁺ K ⁺ ATP-az	Mg ⁺⁺ ATP-az	Ca ⁺⁺ ATP-az	SOD
1-A	5	300 \pm 4.74	270 \pm 6.89	90 \pm 6.51	77 \pm 2.21
1-B	5	340 \pm 7.07	290 \pm 7.90	105 \pm 4.47	85 \pm 1.78
2-A	10	272.5 \pm 4.72	342.5 \pm 4.54	80 \pm 3.24	82 \pm 1.00
2-B	10	304 \pm 2.66	358 \pm 3.31	93 \pm 2.90	90.9 \pm 1.00
3-A	10	241.5 \pm 5.22	296 \pm 3.63	63 \pm 2.12	64.5 \pm 1.18
3-B	10	247.5 \pm 6.15	309 \pm 4.00	68.5 \pm 2.47	96.5 \pm 1.66
4-A	10	201 \pm 3.48	227 \pm 9.04	83.5 \pm 1.97	103.1 \pm 4.28
4-B	10	213.5 \pm 3.25	235 \pm 8.53	92.5 \pm 2.00	108.3 \pm 3.13

Grafik-1

Grupların ATP-az (nmol Pi/hr/mg prot) ve SOD (U/mg prot) Ortalama Değerleri Dağılımı



Tablo-11

Mann - Whitney U Testine Göre Gruplardaki Na⁺K⁺ ATP-az Değerleri Dağılımının Gruplararası Karşılaştırması.
Yanılma olasılığı (α): 0.05

Gruplar	Test Sonucu	Karar: İki grubun dağılımları arasında fark
1A-1B	U=25, P<0.05	vardır
1A-2A	U=48, P<0.05	vardır
1A-3A	U=50, P<0.05	vardır
1A-4A	U=50, P<0.05	vardır
2A-2B	U=100, P<0.05	vardır
2A-3A	U=91, P<0.05	vardır
2A-4A	U=100, P<0.05	vardır
3A-3B	U=63.5, P>0.05	yoktur
3A-4A	U=100, P<0.05	vardır
4A-4B	U=79.5, P<0.05	vardır
1B-2B	U=49.5, P<0.05	vardır
1B-3B	U=50, P<0.05	vardır
1B-4B	U=50, P<0.05	vardır
2B-3B	U=100, P<0.05	vardır
2B-4B	U=100, P<0.05	vardır
3B-4B	U=99.5, P<0.05	vardır

Tablo-12

Man - Whitney U Testine Göre Gruplardaki Mg⁺⁺ ATP-az Değerleri Dağılımının Gruplararası Karşılaştırılması.
Yanılma olasılığı (α): 0.05

Gruplar	Test Sonucu	Karar: İki grubun dağılımları arasında fark
1A-1B	U=20, P>0.05	yoctur
1A-2A	U=50, P<0.05	vardır
1A-3A	U=46.5, P<0.05	vardır
1A-4A	U=48, P<0.05	vardır
2A-2B	U=84, P<0.05	vardır
2A-3A	U=99, P<0.05	vardır
2A-4A	U=100, P<0.05	vardır
3A-3B	U=78, P<0.05	vardır
3A-4A	U=100, P<0.05	vardır
4A-4B	U=64, P>0.05	yoctur
1B-2B	U=50, P<0.05	vardır
1B-3B	U=40.5, P<0.05	vardır
1B-4B	U=50, P<0.05	vardır
2B-3B	U=100, P<0.05	vardır
2B-4B	U=100, P<0.05	vardır
3B-4B	U=100, P<0.05	vardır

Tablo-13

Man - Whitney U Testine Göre Gruplardaki Ca⁺⁺ ATP-az Değerleri Dağılımının Gruplararası Karşılaştırılması.
Yanılma olasılığı (α): 0.05

Gruplar	Test Sonucu	Karar: İki grubun dağılımları arasında fark
1A-1B	U=19.5, P>0.05	yoctur
1A-2A	U=35.5, P>0.05	yoctur
1A-3A	U=48, P<0.05	vardır
1A-4A	U=33, P>0.05	yoctur
2A-2B	U=86, P<0.05	vardır
2A-3A	U=91, P<0.05	vardır
2A-4A	U=50, P>0.05	yoctur
3A-3B	U=70.5, P>0.05	yoctur
3A-4A	U=98, P<0.05	vardır
4A-4B	U=8.5, P<0.05	vardır
1B-2B	U=49.5, P<0.05	vardır
1B-3B	U=50, P<0.05	vardır
1B-4B	U=44, P<0.05	vardır
2B-3B	U=96, P<0.05	vardır
2B-4B	U=55, P>0.05	yoctur
3B-4B	U=99.5, P<0.05	vardır

Tablo-14

Man - Whitney U Testine Göre Gruplardaki SOD Değerleri Dağılımının Gruplararası Karşılaştırılması.
Yanılma olasılığı (α): 0.05

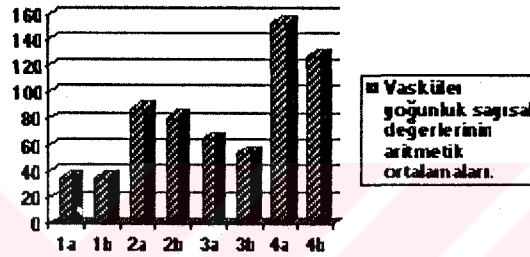
Gruplar	Test Sonucu	Karar: İki grubun dağılımları arasında fark
1A-1B	U=22.5, P<0.05	vardır
1A-2A	U=40.5, P<0.05	vardır
1A-3A	U=49, P<0.05	vardır
1A-4A	U=48, P<0.05	vardır
2A-2B	U=96, P<0.05	vardır
2A-3A	U=100, P<0.05	vardır
2A-4A	U=88.5, P<0.05	vardır
3A-3B	U=100, P<0.05	vardır
3A-4A	U=100, P<0.05	vardır
4A-4B	U=58.5, P>0.05	yoctur
1B-2B	U=45, P<0.05	vardır
1B-3B	U=47.5, P<0.05	vardır
1B-4B	U=50, P<0.05	vardır
2B-3B	U=79.5, P<0.05	vardır
2B-4B	U=98.5, P<0.05	vardır
3B-4B	U=86, P<0.05	vardır

Tablo-15
Vasküler Yoğunluk Ortalama Sayısal Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı
(Aritmetik Ortalama \pm standart hata)

Gruplar	n	A (S ağ)	B (Sol)
1	5	36 \pm 1.69	35 \pm 0.99
2	10	89 \pm 1.92	82 \pm 1.75
3	10	65 \pm 2.35	54 \pm 1.22
4	10	153 \pm 5.05	127 \pm 5.06

Grafik -2

Grupların vasküler yoğunluk ortalama sayısal değerleri dağılımı.



Tablo-16
Mann-Whitney U Testine Göre Gruplardaki Vasküler Yoğunluk Sayısal Değerleri Dağılımının Gruplararası Karşılaştırması. Yanılma olasılığı (α):0.05

Gruplar	Test Sonucu	Karar: İki grubun dağılımları arasında fark
1A-1B	U=14.5, P>0.05	yoktur
1A-2A	U=50, P<0.05	vardır
1A-3A	U=50, P<0.05	vardır
1A-4A	U=50, P<0.05	vardır
2A-2B	U=60, P>0.05	yoktur
2A-3A	U=100, P<0.05	vardır
2A-4A	U=100, P<0.05	vardır
3A-3B	U=90.5, P<0.05	vardır
3A-4A	U=100, P<0.05	vardır
4A-4B	U=87.5, P<0.05	vardır
1B-2B	U=50, P<0.05	vardır
1B-3B	U=50, P<0.05	vardır
1B-4B	U=50, P<0.05	vardır
2B-3B	U=100, P<0.05	vardır
2B-4B	U=100, P<0.05	vardır
3B-4B	U=100, P<0.05	vardır

TARTIŞMA

İlk kez 1935 yılında plasentada tarif edilen anjiogenesis yeni mikro damar oluşumunu anlatmada kullanılmaktadır. Hiperplastik, embriyonik, neoplastik dokuların büyümesi ve şekillenmesinde, yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Aynı zamanda diyabetik retinopati, arterioskleroz gibi anjiogenik hastalıkların önemli bir belirleyicisidir. Neoplastik lezyonların histolojik derecelendirmesinde anjiogenesis ve endotel proliferasyonu ihmal edilmeyecek bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bir tümörün damarlaşıma döneminden önce teşhis edilip, anjiogenesis önlediği takdirde yok edilebileceği düşünülebilir. Ekstra kranial tümörlerle kıyaslandığında beyin tümörleri önemli bir anjiogenik faktör kaynağıdır. Bu nedenle SSS'nin primer veya metastatik tümörlerinde anjiogenesis oldukça fazladır. Normalde beyin vasküler yapılarındaki endotel hücrelerinde proliferasyon oldukça azdır. Bu nedenle beyinde vasküler değişiklikler kolaylıkla saptanır ve anjiogenesis için iyi bir model teşkil eder^(19,25,26,27,47). Beyin damarlarında endoteller sıkı olarak birleşmiş, porlar azalmış, bazal membran astrosit süreçleriyle birleşerek kan beyin bariyerini oluşturmuştur. Özellikle patolojik durumlarda, normal damar kolaylıkla anjiogenesis yapabilir ve tümoral oluşumu taklit eder. Böyle bir modelde anjiogenesis mikroskobik olarak ölçülebilir⁽⁴⁷⁾.

Bizim bu çalışmamızda David Zagzag 'ın⁽⁴⁷⁾ 1989 yılında tavşan beynine VX₂ karsinomu implantasyonu ile oluşturduğu anjiogenesis modeli örnek alınmıştır. Biz tümör yerine anjiogenesis yapabileceğini düşündüğümüz kollagen ve interlökin-1 'i domuz parietal korteksinden yaklaşık 2mm derine implante ettik. Bu derinlikteki anjiogenik faktör normal kortikal damarları kolaylıkla uyarmakta ve yanıt alınabilmektedir. Genellikle, neoanjiogenesis dört haftada tamamlanarak kortikal damarlarla birleşir. Kapiller dansitelerinde artış olur, kan-beyin bariyerinden yoksun yeni kapillerlerde eritrositler görünür hale gelir.

Krum⁽⁵¹⁾ embriyonal transplantasyon yaptığı doku etrafında immün reaktivasyonun astrositik kontakt ve vasküler basal membran formasyonunun tamamlandığı dördüncü haftadan sonra azaldığını tespit etti. Bu dönemde laminin ve fibronektin gelişimi tamamlanmıştı. Dymecki⁽¹⁷⁾ transplantasyondan üç gün sonra damarlaşımanın başlayacağını, yedinci gün zayıf damarların teşekkül edeceği 14. gün geniş branşlı damarların görüleceği ve 28. günde konakçı damarına benzer damarlaşımanın olacağını gösterdi. Wakaro⁽⁴⁶⁾ gliom implantasyonundan 14 gün sonra kontrast tutabilecek derecede anjiogenesisin ortaya çıktığını bildirdi. Fike⁽²³⁾ beyin termal lezyonunda vaskülaritenin 3. haftada maksimale ulaştığını söylerken, Kinoshita⁽⁴⁸⁾ beyin yaralanmasında 7. gün astrositlerin arttığı neovaskülarizasyonun hızlandığı, birinci ay sonunda laminin'in travma bölgesine ulaşmasıyla düzelmenin tamamlandığını gösterdi. Bu nedenle modelimizde anjiogenesisin tamamlanacağını düşündüğümüz dördüncü haftadan sonra beyin biyopsisini alarak inceledik. Anjiogenik madde korteks içine yerleştirilirken travmaya bağlı olarak bir miktar bariyer bozulmakta ve anjiogenesis provoke olmaktadır. Bu provokasyon implante edilen anjiogenik özelliğe sahip materyalle dahada artmaktadır. Solid halde yerleştirilen maddenin anjiogenesis'e etkisi solusyon halindeki orana daha fazla olmaktadır. Solusyon halindeki materyallerin kolaylıkla rezorbe olmaları nedeniyle yeterli anjiogenesis yapacak fırsat bulamamaktadır⁽²⁾. Greene domuz korneasına

implante ettiği tümörün korneanın vaskülarizasyonu olmadığından büyümediğini, oysa aynı dokuyu vaskülaritesi iyi olan tavşan kasına implante ettiğinde tümörün kolayca büyüdüğünü göstermiştir. Tümör hücreleri konak vasküler yatağından millipore filtresi ile ayrılırsa tümör damarlaşmaya devam etmektedir. Bu durum filtreden kolaylıkla diffüze olabilen tümör kaynaklı anjiyojenik faktörün varlığını ortaya koymaktadır⁽²⁵⁾. Anjiyojenik faktör ilk kez 1970 yılında izole edilmiş, 1976 yılında doku kültüründe üretilmiş, günümüze kadar birçok anjiyojenik faktör izole edilmiştir. Transforming growth faktör alfa ve beta, asidik ve bazik fibroblastik growth faktörler morfojenik, kemotaktik, mitojenik, anjiyojenik ve nörotrofik etkiye sahiptirler. İskemiye bağlı vaskülarite artışında önemli rol oynarlar ve endotel proliferasyonunu sağlarlar^(27,15,5,65,56,63). Travma bölgesinde NADP (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) hidrojenize olarak endotel proliferasyonunu sağlar⁽⁵⁰⁾. PDWH(Platelet derived wound healing) faktör ve NG(nerve growth) faktör travmada yaranın vaskülarizasyonunu artırarak iyileşmesini sağlar^(36,37). Gliom hücrelerinin salgıladığı vasküler epidermal growth faktör, tümör nekroz faktör anjiogenezisi stimule eder⁽⁹⁾.

Kıdo⁽⁴⁷⁾ normal ve gliomlu rat'a intravenöz TNF-alfa (tümör nekroz faktör-alfa) enjekte ettikten sonra, normal rat'ta bir değişiklik olmazken, gliomlu rat vasküler yatağında bir saatte kan beyin bariyerinin bozulduğunu tespit etti. Bu bozukluk 7. gün çok artmıştı, onuncu gün geniş bir alanda ödem, nekroz, mononükleer infiltrasyonla birlikte anjiogenesis başladı. Laminin, fibronektin, kollagen, interlökin gibi anjiyojenik maddelerin kortekse implantasyonundan 6 saat sonra implantasyon bölgesinde küçük hemorajik alanlar meydana gelir, çevre damarlardan poli ve mononükleer hücreler penetre olur. Bir gün sonra komşu damarlar genişler, endotel hücreleri ve perisitler aktive olur. İmplantasyondan 2 gün sonra damarlardaki dilatasyon maksimal düzeye ulaşır, makrofaj, fibroblast, fibrin materyali ve eritrositler açığa çıkar. Genişleyen ana damarda endotel ve perisitler hızla çoğalmaya başlar, bazal laminada fragmentasyon görülür; laminin, kollajen ve fibronektin belirginleşir. Perisitler ve endotel hücreleri anjiyojenik maddeye doğru göçe başlar, endoteller anjiyojenik dokunun intersellüler mesafesi ile birleşecek şekilde paralel silüet oluşturur. Endotel hücreleri yarık şeklinde lümen oluşturmaya başlarlar. Böylece ana damarla anjiyojenik doku arasında temas sağlanmış olur. İmplantasyondan 3 gün sonra yeni kapillerler belirginleşir. Bazal lamina devamlı olarak endotel proliferasyonunu ve migrasyonunu stimule eder⁽²⁷⁾.

Yeni teşekkül eden SSS'i vasküler yapılarının gerçek neoplasm'ını yoksa stimulusa bağlı olarak fenotipik bir değişim sonucu mu meydana geldikleri kesin olarak bilinmemektedir. Anjiyojenik faktörlerin çoğu vasküler endotelial hücreleri etkileyerek endotel hücrelerin mitozunu stimule ederler ve migrasyonunu başlatırlar. Bazı anjiyojenik faktörler ise konağın hücrelerini özellikle makrofajları mobilize ederek endotelial büyüme faktörlerinin açığa çıkmasını sağlarlar. Bu yolla indirekt anjiogenesis'e yardım ederler⁽²⁷⁾. Normal hücrelerde anjiogenesisi stimülasyon ve inhibisyonla kontrol eden intra ve ekstrasellüler birçok maddeler mevcuttur. Normal doku ve tümör dokusu anjiyojenik faktörleri arasında çok büyük fark olmamakla birlikte tümör dokusunda inhibitör etkinin azalmasına bağlı olarak gittikçe artan oranda anjiogenesis devam eder⁽⁴⁷⁾. Tümör damar endotelinde çok sayıda porlar ortaya çıkar, intersellüler birleşim yerleri açılır, pinositik veziküller artar. Endotellerin lumene

bakan yüzleri katlanır, bu nedenle tümöre genellikle ödem eşlik eder. Endotel hücreleri içinde vakuol ve tubuler yapılar ortaya çıkar⁽³⁹⁾.

Agnalı⁽¹⁾ kollajen, laminin ve fibronektinin NPF(norite promoting factor) gibi anjiogenesisi başlattığını söylemiştir. Iruelu⁽⁴¹⁾ tip1 kollajenin anjiogenesisi başlattığını, buna bağlı olarak fibronektinin arttığını söylemiştir. Sieves⁽⁷⁷⁾ matür memeli beynine interlökin enjeksiyonu ile gliosis ve neovaskülarizasyon meydana getirmiştir. Amberger⁽⁶⁾ endotel mitojenik faktör, ektodermal growth faktör ve heparinin anjiogenesisite etkili olduğunu bildirmiştir. Bu nedenlerle biz kollajen, interlökin ve heparinin anjiogenesisiteki rolünü incelemeyi amaçladık.

Işık ve elektron mikroskobu incelemesinde 2., 3. ve 4. grupları kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda neoanjiogenesis lehine değişiklik tespit ettik . Metastatik tümörlerde olduğu gibi ışık mikroskobunda neoanjiogenesisi derecelendirme yöntemine benzer bir şekilde birim alandaki damarlar sayıldı^(42,47). Vasküler yoğunluğun gruplar arası karşılaştırmasını yaptık. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda diğer grupların vasküler yoğunluklarında artış saptadık ve bu artışı istatistiki olarak anlamlı bulduk. Aynı zamanda A gruplarındaki vasküler yoğunluğu B gruplarına göre bir miktar yüksek olarak tespit ettik, fakat istatistiki olarak anlamlı bir fark bulamadık. Vasküler yoğunluk en fazla 4. grupta olmak üzere sırasıyla 2. ve 3. gruplarda artmıştı. Bir aminoglikan olan ve tümörün konakçı tarafından reddedilmemesinde önemli payı bulunan heparinin anjiogenesisite etkili olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Kollajen ve interlökin tek tek kullanıldığında birbirlerine benzer şekilde anjiogenesisite etkilerken, birlikte kullanıldıklarında anjiogenesisite bir miktar daha artma meydana gelmiştir. Alınan doku örneklerinin ortak bir özelliği bol miktarda makrofaja rastlanmasıydı. Bunların bir kısmında hemosiderin pigmenti tespit edildi. Histiosit proliferasyon, kıvrıntılı damar yapıları, endotel proliferasyonu ve gliosis gruplar arasındaki ortak görüntülerdi.

Flaris⁽²⁴⁾ mikroglia, makrofaj aktivasyonu ile kollajen ve fibronektin birikimine bağlı olarak vaskülarizasyon olduğunu, bu vaskülarizasyonun 28 gün devam ettiğini açıklamıştır. Bizim beyin dokusu içine implante ettiğimiz kollajenin negatif feed back mekanizmasına göre makrofaj akımını inhibe etmesi beklenmeliydi. Aynı düşünceden yola çıkarak; makrofajların salgıladığı interlökinin dokuya verilmesiyle yine makrofaj penetrasyonunun inhibe edilmesi ümit edilmekteydi. Ancak bu iki maddenin tek tek ve birlikte kullanıldığı her üç grupta makrofajlar ortamda fazla miktarda görülmüştür. Bu durum anjiogenesisin başlaması ile birlikte makrofajların bölgeye gelerek yeni kollajen ve interlökin birikimine neden olduklarının göstergesi olabilir. Çünkü İL implante edildiği anda doku içinde yüksek düzeyde bulunmakta, etkinliği 6 saat devam etmekte, fakat daha sonra etkinliği tedricen azalmaktadır. İL çevre dokuda vasküler permeabilityyi bozarak ödeme neden olmaktadır. Jacobs intratumoral, Yung intratekal İL kullanarak tümörlerde önemli küçülme tespit ettiklerini, çevre dokuda ödem gözlediklerini açıklamışlardır. Ancak bu araştırmacılar İL 'le beraber lenfositlerle aktive edilmiş killer hücreleri de kullanmışlar ve vaskülarite değişikliğini incelemişlerdir⁽⁷³⁾. Alexander⁽⁴⁾ İL'nin normal beyni etkilemediğini tümörlü beyinde bariyeri bozduğunu söylemiştir. Clark⁽¹³⁾ orta serebral arter oklüzyonuna bağlı infarktda astroglia aktivitesinin arttığını, fibriler astroprotein immunoreaktivitesinin yükseldiğini, lezyon kavitesinin fibroblast,

laminin ve kollajenle dolduğunu, neoangiogenesisle birlikte bölgeyi makrofajların istila ettiğini açıklamıştır. Morioha⁽⁶²⁾ fare gliomunda mikrogliya ve makrofajın maksimal düzeye ulaştığını ve bununla birlikte angiogenesisin arttığını göstermiştir. Normalde beyin tümörleri lökositlerle infiltre edilmektedir. Bu hücrelerin % 70-80 'i lenfosit orjinlidir, bunlarında % 70-80 'i T, % 20-30 'u B hücreleridir⁽⁴⁻²⁰⁾. Bizim lezyonda gördüğümüz hücrelerin büyük çoğunluğunda T lenfositleridir. Deneklerimize antibiyotik verilmiş enfeksiyon belirtisi gözlenmemiştir, ancak yinede bir kısım hücreler enfeksiyon kaynaklı olabilir. Glioblastomdaki infiltratif hücrelerin büyük çoğunluğunu T lenfosit ve makrofajlar oluşturur⁽⁵³⁾. Glioblastom başta olmak üzere çoğu beyin tümörleri T cell supresor faktör, transforming growth faktör, anjiyogenik faktör salgılar⁽³¹⁻⁵³⁾. Bazılarına göre bu her üç faktör aynı anlamda kullanılmaktadır. Bu maddeler İL ve lenfokin sentezini inhibe ederek tümör hücrelerini immunolojik ve sitotoksik etkilerden korumaktadırlar^(10,71). Ancak bizim ortama ilave ettiğimiz İL immunolojik etki dışında angiogenesisi bir miktar stimule etmiştir.

Endotel hücreleri faktör-8, konverting enzim, kollajen, elastin, glikozaminoglikanlar, kan grubu antijenleri ve prostasiklin salgılamakta, neurotransmitter, polipeptid ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında rol oynayan enzim reseptörleri içermektedirler^(19,43). Bu faktörlerin bazıları doğrudan endotel hücrelere etki ederek mitozu stimule etmekte, bazıları makrofajları stimule ederek endotel büyüme faktörünün açığa çıkmasıyla indirek angiogenesisi neden olmaktadır. Bizim biyopsi örneklerimizde vizyone edilen makrofajların neoangiogenesisi stimule ettikleri düşünülebilir⁽²⁷⁾. Muhtemelen makrofajlar herhangi bir anjiyogenik stimülasyon almadan tümör ve damarların çevresini kuşatabilmektedirler⁽³⁹⁾.

Tümör bölgesinde normal beyin dokusu harabiyeti sürecinde, vasküler yapının oluşumuna kadar geçen anoksik devrede, eccosanoid prekürsörleri olan yirmi karbonlu poliansatüre yağ asitleri hücre içinde ve hücreler arasında birikmektedir^(29,49,54,58). Buna bağlı olarak cyclooxygenase, phospholipase, lipoxygenase, xanthin oxidase aktivitesinin artışı sonucu eccosanoid'ler oksidasyonla yıkılarak çoğunluğu hücre üzerinde toksik etkiye sahip olan prostoglandinler (PG-G₂, D₂, I₂, F₂, E₂, F_{2α}), thromboxane-A₂, hydroperoxy-eccosatetraenoic, leucotriene deriveleri sentez edilir^(14,29,49,52,54,55,76,83). Anstabil endoperoksitler PGH₂'ye dönerken diğer süperoksit anyonlar spontan olarak veya süperoksit dismutaz etkisiyle H₂O₂ 'ye dönerler. Süperoksit anyonlar solunum yapan hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptirler, ayrıca normal damar duvarı metabolizmasını deprese ederek proliferatif vaskülopatiye neden olurlar. Bizim olgularımızda angiogenesis yanında endotel proliferasyonu ile seyreden vaskülopatinin nedeni büyük bir ihtimalle bu süperoksit anyonlardır. Süperoksit radikallerin sitokrom C 'nin azalmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu reaksiyonu SOD enzimi inhibe etmektedir. Böylece ksantin oksidaz enzimi elimine edilerek oksijen kaynağı replase edilmiş olur. Hemen bütün canlı türlerinde SOD aktivitesinin yüksek olması süperoksit radikallerin zarar verici etkisine karşı organizmayı korumada bu enzimin hayati rol oynadığını ortaya koyar^(52,55,59). Bizim olgularımızda, anjiyogenik maddelerin beyin içine implantasyonundan dört hafta sonra alınan beyin örneklerinde SOD seviyeleri ölçüldü. Beyin de angiogenesis tamamlanmış anoksi ortadan kalkmıştı. SOD seviyesi serum fizyolojik inokülasyonu yapılan 1.grupla kıyaslandığında;

kollagen+İL implantasyonu yapılan grupta (4. grup) daha fazla olmak üzere 2. ve 3. grupta da bir miktar yükselmiştir. Aynı zamanda heparin verilen gruplarda da SOD seviyelerinde yükselme olmuştur. Bu durum heparinin dokuda uzun süreli etki sağladığını ve SOD seviyesinin doku rejenerasyonu, ortamdaki superoksit anyonlarıyla doğru orantılı bir artış gösterdiğini düşündürmektedir. Schettini⁽⁷⁶⁾ balon şişirerek beyin dokusunda travma meydana getirmiş, daha sonra SOD düzeyini tespit etmiştir. Olgularında SOD seviyesi ilk 60 dakikada normalin 5 katına çıkmış daha sonra bu seviye azalarak 100 dakikada normalin iki katına, daha sonra tekrar yükselerek 24 saat sonunda normalin üç katına çıkmıştır. Bizim örneklerimiz 4 hafta sonra alındığından bulgularımızın Schettini ile uyumlu olması beklenemez, ancak bu kadar uzun sürenin geçmesine rağmen doku örneklerinde rejenerasyon ve anoksi bulgularının devam etmesi ve bunlara bağlı olarak SOD seviyesinin bir miktar yüksek olması devam eden angiogenesis nedeniyle metabolizmanın normalden farklı olduğunu düşündürmektedir.

ATP-az hücrenin iyonik-osmotik dengesini ve aktif transportu sağlar⁽⁵⁹⁾. Bu nedenle zedelenen ve rejenere olan dokuda enzim aktivitesinin değişmesi beklenir. Na-K, Mg ve Ca 'a bağlı ATP-az seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında 2., 3. ve 4. gruplarda sırasıyla tedrici bir azalma meydana gelmiştir. Bununla beraber SOD enzim sisteminde olduğu gibi heparin verilen gruplarda ise ATP-az seviyelerinde bir miktar artış olmuştur. ATP-az enzim sistemlerinin doku rejenerasyonu sürecindeki önemleri gözönüne alındığında aktivitelerindeki artışın rejenerasyonla paralellik gösterdiği, SOD sisteminin ise hücreleri sitotoksik ürünlere karşı koruduğu düşünüldüğünde, enzim sonuçlarına göre yorum yapıldığında, heparinin dokuda uzun süreli etki sağladığı, kollagen ve İL 'in ise rejenerasyon sürecini hızlandırdığı ortaya çıkmaktadır.

SONUÇ

Işık ve elektron mikroskobu incelemesinde 2., 3. ve 4. grupları kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda neoanjiogenesis lehine değişiklik tespit ettik. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda diğer grupların vasküler yoğunluklarında artış saptadık ve bu artışı istatistiki olarak anlamlı bulduk. Aynı zamanda A gruplarındaki vasküler yoğunluğu B gruplarına göre bir miktar yüksek olarak tespit ettik, fakat istatistiki olarak anlamlı bir fark bulamadık. Vasküler yoğunluk artışı en fazla 4. grupta olmak üzere sırasıyla 2. ve 3. gruplarda artmıştı. Bir aminoglikan olan ve tümörün konakçı tarafından reddedilmemesinde önemli payı bulunan heparinin anjiogenesisite etkili olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Kollagen ve interlökin tek tek kullanıldığında birbirlerine benzer şekilde anjiogenesisite etkilerken, birlikte kullanıldıklarında anjiogenesisite bir miktar daha artma meydana gelmiştir.

SOD seviyesi serum fizyolojik inokülasyonu yapılan 1.grupla kıyaslandığında; kollagen+İL implantasyonu yapılan grupta (4. grup) daha fazla olmak üzere 2. ve 3. grupta da bir miktar yükselmiştir. Aynı zamanda heparin verilen gruplarda da SOD seviyelerinde yükselme olmuştur.

Na-K, Mg ve Ca 'a bağlı ATP-az seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında 2., 3. ve 4. gruplarda sırasıyla tedrici bir azalma meydana gelmiştir. Bununla beraber SOD enzim sisteminde olduğu gibi heparin verilen gruplarda ise ATP-az seviyelerinde bir miktar artış olmuştur. ATP-az enzim sistemlerinin doku rejenerasyonu sürecindeki önemleri gözönüne alındığında aktivitelerindeki artışın rejenerasyonla paralellik gösterdiği, SOD sisteminin ise hücreleri sitotoksik ürünlere karşı koruduğu düşünüldüğünde, enzim sonuçlarına göre yorum yapıldığında, heparinin dokuda uzun süreli etki sağladığı, kollagen ve İL 'in ise regenerasyon sürecini hızlandırdığı ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak kollagen ve İL tek başlarına neovaskülarizasyonu stimule etmişlerdir. Bununla beraber birlikte kullanıldıklarında ise neovaskülarizasyon artışına sinerjik etki göstermişlerdir. Glikozaminoglikanların neovaskülarizasyona anlamlı bir etkisi olmamıştır. Doku örneklerimizi daha erken dönemde alsaydık enzim aktivitelerinin daha yüksek olması ve daha erken döneme uygun neovaskülarizasyon sürecini histopatolojik olarak değerlendirebilmemiz olasıydı. İL, kollajen ve Glikozaminoglikan'ın neovaskülarizasyona, ATP-az ve SOD sistemlerine kesin olarak ne derece etkili olduğunu söylemek zordur. Ancak, yapılacak yeni çalışmalarla daha erken dönemlerde alınacak örneklerden sağlanacak parametrelerle, İL - kollajen ve glikozaminoglikan'ın neovaskülarizasyon sürecine etkileri hakkında daha kesin konuşmamız mümkün olacaktır.

ÖZET

İlk kez 1935 yılında plasentada tarif edilen neovaskularizasyon yeni mikro damar oluşumunu anlatmada kullanılmaktadır. Hiperplastik, embriyonik, neoplastik dokuların büyümesi ve şekillenmesinde, yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Aynı zamanda diabetik retinopati, arterioskleroz gibi anjiyjenik hastalıkların önemli bir belirleyicisidir. Neoplastik lezyonların histolojik derecelendirmesinde angiogenesis ve endotel proliferasyonu ihmal edilemeyecek bir kriter olarak kabul edilmektedir. Bir tümörün damarlaşma döneminden önce teşhis edilip, angiogenesis önlenmediği takdirde yok edilebileceği düşünülebilir. Ekstra kranial tümörlerle kıyaslandığında beyin tümörleri önemli bir anjiyjenik faktör kaynağıdır. Bu nedenle SSS'nin primer veya metastatik tümörlerinde angiogenesis oldukça fazladır. Normalde beyin vasküler yapılarındaki endotel hücrelerinde proliferasyon oldukça azdır. Bu nedenle beyinde vasküler değişiklikler kolaylıkla saptanır ve angiogenesis için iyi bir model teşkil eder^(19,23,26,27,37).

Tümörde kendini besleyecek yeni damarlaşma olmadığı takdirde tümörün büyümesi ve metastaz yapması beklenemez. Çalışmamızda, tümörde neovaskularizasyon yapabilecek biyokimyasal ve histolojik maddelerin tespit edilerek, bu maddelerin bloke edilmesi halinde neovaskularizasyonun önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle neovaskularizasyonda rol oynayan kollajen, interlökin-1 ve glikozaminoglikanı normal domuz beyin'ine inoküle ederek, bir ay sonra biyopsi aldık. Numuneler ışık ve elektron mikroskobunda incelendi, ATP-az ve SOD aktiviteleri ölçüldü.

Işık ve elektron mikroskobu incelemesinde 2., 3. ve 4. grupları kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda neoangiogenesis lehine değişiklik tespit ettik. Metastatik tümörlerde olduğu gibi ışık mikroskobunda neoangiogenesisi derecelendirme yöntemine benzer bir şekilde birim alandaki damarlar sayıldı^(42,47). Vasküler yoğunluğun gruplar arası karşılaştırmasını yaptık. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda diğer grupların vasküler yoğunluklarında artış saptadık ve bu artışı istatistiki olarak anlamlı bulduk. Aynı zamanda A gruplarındaki vasküler yoğunluğu B gruplarına göre bir miktar yüksek olarak tespit ettik, fakat istatistiki olarak anlamlı bir fark bulamadık. Vasküler yoğunluk artışı en fazla 4. grupta olmak üzere sırasıyla 2. ve 3. gruplarda artmıştı. Bir aminoglikan olan ve tümörün konakçı tarafından reddedilmemesinde önemli payı bulunan heparinin angiogenesisi etkili olmadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Kollagen ve interlökin tek tek kullanıldığında birbirlerine benzer şekilde angiogenesisi etkilerken, birlikte kullanıldıklarında neoangiogenesisi daha fazla artma meydana gelmiştir.

Süperoksit anyonlar solunum yapan hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptirler, ayrıca normal damar duvarı metabolizmasını deprese ederek proliferatif vaskülopatiye neden olurlar. Hemen bütün canlı türlerinde SOD aktivitesinin yüksek olması süperoksit radikallerin zarar verici etkisine karşı organizmayı korumada bu enzimin hayati rol oynadığını ortaya koyar^(52,55,59). Bizim olgularımızda, anjiyjenik maddelerin beyin içine implantasyonundan dört hafta sonra alınan beyin örneklerinde SOD seviyeleri ölçüldü. Beyin de angiogenesis tamamlanmış anoksi ortadan kalkmıştı. SOD seviyesi serum fizyolojik inokülasyonu yapılan 1.grupla kıyaslandığında; kollagen+İL

implantasyonu yapılan grupta (4.grup) daha fazla olmak üzere 2. ve 3. grupta da bir miktar yükselmiştir. Aynı zamanda heparin verilen gruplarda da SOD seviyelerinde yükselme olmuştur.

ATP-az hücrenin iyonik-osmotik dengesini ve aktif transportu sağlar⁽⁹⁾. Bu nedenle zedelenen ve rejenere olan dokuda enzim aktivitesinin değişmesi beklenir. Na-K, Mg ve Ca 'a bağlı ATP-az seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında 2., 3. ve 4. gruplarda sırasıyla tedrici bir azalma meydana gelmiştir. Bununla beraber SOD enzim sisteminde olduğu gibi heparin verilen gruplarda ise ATP-az seviyelerinde bir miktar artış olmuştur. ATP-az enzim sistemlerinin doku rejenerasyonu sürecindeki önemleri gözönüne alındığında aktivitelerindeki artışın rejenerasyonla paralellik gösterdiği, SOD sisteminin ise hücreleri sitotoksik ürünlere karşı koruduğu düşünüldüğünde, ortaya çıkan enzim sonuçlarına göre yorum yapıldığında, heparinin dokuda uzun süreli etki sağladığı, kollagen ve İL 'in ise regenerasyon sürecini hızlandırdığı ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak kollagen ve İL tek başlarına neovaskülarizasyonu stimule etmişlerdir. Bununla beraber birlikte kullanıldıklarında ise neovaskülarizasyon artışına sinerjik etki göstermişlerdir. Glikozaminoglikanların neovaskülarizasyona anlamlı bir etkisi olmamıştır. Doku örneklerimizi daha erken dönemde alsaydık enzim aktivitelerinin daha yüksek olması ve daha erken döneme uygun neovaskülarizasyon sürecini histopatolojik olarak değerlendirebilmemiz olasıydı. İL, kollajen ve glikozaminoglikan'ın neovaskülarizasyona, ATP-az ve SOD sistemlerine kesin olarak ne derece etkili olduğunu söylemek zordur. Ancak, yapılacak yeni çalışmalarla daha erken dönemlerde alınacak örneklerden sağlanacak parametrelerle, İL - kollajen ve glikozaminoglikan'ın neovaskülarizasyon sürecine etkileri hakkında daha kesin konuşmamız mümkün olacaktır.

LITERATÜR

- 1-Agnah LF: Regeneration in CNS. *Advances and Technical Standarts in Neurosurgery* 16: 3-50, 1988.
- 2-Akalan N, Grady MS: Angiogenesis and the blood-brain barrier in intracerebral solid and cell suspension grafts. *Surg Neurol.* 42: 517-22, 1994.
- 3-Alen IG, Louis TM, Kopelman AE. Brain Prostaglandin E₂ and F_{2alpha} Following Neonatal Asphyxia in The Guinea Pig. *Biol.* 1982; 42: 8 - 14.
- 4-Alexander JT, Saris SC, Old H: The effect of interleukin-2 on the bloodbrain barrier in the gliosarcoma rat model. *J. Neurosurg* 70:92-6, 1989.
- 5-Alvarez JA, Baird A, Zatum A, Daviher J, Choshy R, Gonzales AM, Stopu EG: Localization of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human glial neoplasms. *Mod. Pat.* 5(3): 303-7,1992.
- 6-Amberger H, Tontsch U, Lamkin P, Gabbiani G, Baver HC: Two cloned cerebral endothelial cell phenotypes an invitro model for angiogenesis. *Exs.* 61: 244-9, 1992.
- 7-Arese P, De Flora A. Pathophysiology of Hemolysis Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Seminars in Hematology. 1990; 27: 1- 40.
- 8-Atkinson A, Gotenby AD, Lowe AG. The Determination of Inorganic Orthophosphate in Biological Systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 320: 195, 1973.
- 9-Azn AC, Mitogvariia WP, Medvedev VG, BaratoshVili IK, Barybin AS: Effects of tumor necrosis factor on the tonus of cerebral arteries. *Biol. Med.* 110(8):121-4, 1990.
- 10-Bhondeley MK, Mehra RD, Mehra NV, Mohapatra AK, Tandon PW, Roy S, Bijlani V. Imbalances in T cell subpopulations in human gliomas imbalances in T cell subpopulations in human gliomas. *J. Neurosurg* 68: 584-93, 1988.
- 11-Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike JA: Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56:1106-11, 1985.
- 12-Carrel RW, Winterboun CC, Rachmilewitz EA. Activated Oxygen and Hemolysis. *Br. J. Haematol.* 1975; 30: 259.
- 13-Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feverstein GZ, Barone FC: Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke. *Brain Res. Bull.* 31(5): 565-72, 1993.
- 14-Cooper AJL, Pulsinelli WA, Duffy TE: Glutathione and ascorbate during ischemia and postischemic reperfusion in rat brain. *J. Neurochem.* 35:1242-5,1980.
- 15-Cuecras P, Gimenez G, Carceller F, Cuevas B, Crespo A: Single topical application of human recombinant basic fibroblast growth factor (rb FGF) promotes neovascularization. *Surg. Neurol.* 39(5): 380-4, 1993.
- 16-Czapski G, Ilan YA. On the Generation of The Hypoxylation Agent From Superoxide Radical Photochem Photobiol 1978;28:651.
- 17-Dymechi J, Wierzba-Bobrowicz T, Malec I, Medynsha E, Poszwinska Z: Development of vessels in the fetal cortical transplant depending on the place of grafting in the rat brain. *Acta-Neurobiol-Exp-Warsz.* 50(4-5):394-403, 1990.
- 18-Eguchi I , Saltman P. Kinetics and Mechanisms of Metal Reduction by Hemoglobin. *Inorg Chem* 1987; 26:3664.
- 19-Enzinger FM, Weiss SW: *Soft tissue tumors*, second edition, St. Louis, Washington D.C. , Toronto, p. 490, 1988.
- 20-Farmer JP, Antel JP, Freedman M, Cashman NR, Rode H , Villemore JG: Characterization of lymphoid cells isolated human gliomas. *J. Neurosurg* 71:528-533, 1989.
- 21-Fee A. Is Superoxide Important to Oxygen Poisoning. *Trends Biochem Sci* 1982; 7:84.

- 22-Fishman RA: Steroids in the treatment of brain edema. *The New England J Med* 306 (6): 359 - 360, 1982.
- 23-Fike JR, Gubbel GT, Satoh T, Stauffer PR: Normal brain response after interstitial microwave hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 7(5): 795-808, 1991.
- 24-Flaris NA, Hickey NF: Development and characterization of an experimental model of brain abscess in the rat. *Am. J. Pathol.* 14(6): 1299-307, 1992.
- 25-Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 49:275-288, 1970.
- 26-Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 46:467-473, 1986.
- 27-Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235:442-7, 1987.
- 28-Fridovich, I. Superoxide Dismutase. *Ann. Rev. Biochem* 1975; 44:147.
- 29-Gactani P: Ex vivo release of eicosanoid from human brain tissue: It's relevance in the development of brain edema. *Neuroradiology* 28:853-8, 1991.
- 30-Gilbert DL. *Oxygen and Living Processes. An Interdisciplinary Approach.* New York, Springer Verlag 1981.
- 31-Good RA, Papermaster BW: Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. *Advances immun* 4:1, 1964.
- 32-Guyton AG. *Textbook of Medical Physiology.* WB Saunders Comp. London, 1976.
- 33-Halliwell B. *Superoxide and Hydroxylation Reactions* Webster, London, 1982, pp. 335-349.
- 34-Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, England, Clarendon 1987.
- 35-Harrison R, Lunt GG. *Biological Membranes: Their Structure and Function.* Thomson Litho Ltd East Kilbride 1980.
- 36-Hiraizumi Y, Transfelat EE, Kawaharu W, Fiegel WD, Knighton D, Sung JH: The effect of growth factor formula (platelet derived wound healing formula) in experimental spinal cord injuries. *J. Am. Paraplegia Soc.* 15(1): 7-13, 1992.
- 37-Hiraizumi Y, Transfelat EE, Kawaharu W, Sung JH, Knighton D, Fiegel WD: In vivo angiogenesis by platelet-derived-wound-healing-formula (PDWHF) in injured spinal cord. *Brain-Res. Bull.* 30(3-4): 353-7, 1993.
- 38-Hirano A, Matsui T: Vascular structures in brain tumors. *Human Pathology* 6:611-621, 1975.
- 39-Hitchcock ER, Morris CS: Mononuclear cell infiltration in central pations of human astrocytomas. *J. Neurosurg* 68:432-7, 1988.
- 40-Hoffman J. The Red Cell Membrane and The Transport of Sodium and potassium. *Amer J. Med* 1966; 41:666.
- 41-Iruela A, Rispe ML, Diglio CA, Sage EH: Modulation of extracellular matrix proteins by endothelial cells undergoing angiogenesis invitro. *Arterioscler-Thromb.* 11(4): 805-15, 1991.
- 42-Ito T, Kitamura H, Nahamura N, Kameda Y, Kamsawu M: A comparative study of vascular proliferation in brain metastasis of lung carcinomas. *Virchows-Arch.A. Pathol. Anat. Histopathol.* 423(1): 13-7, 1993.
- 43-Jaffe EA: Endothelial cells and the biology of factor VIII. *The New England Journal of medicine* 235:442-7, 1987.
- 44-Joost J. Oppenheim, MD; Francis W. Ruscetti, PhD; & Connie Faltynek, PhD : Cytokines. In. Sites D.P, Terr A. I (Eds). *Basic and Clinical Immunology*, seventh edition. Prentice - Hall International Inc. 1991, pp: 78 - 100.
- 45-Joseph C, Peter A. : Role of Oxygen - Derived Free Radicals and Metabolites in Leukocyte-Dependent Inflammatory Regetions. *Am Assoc Pathol.* 1982; 107: 263-303.
- 46-Jucker M, Bialubuh P, Hagy T, Ingram DH: Laminin immunohistochemistry in brain is dependent on method of tissue fixation. *Brain Res.* 17: 586(1), 166-70, 1992.
- 47-Kido G, Wright JL, Merchart RE: Acute effects of human recombinant tumor necrosis factor-alpha on the cerebral vasculature of the rat in both normal brain and in an experimental glioma model. *J Neurooncol.* 10(2): 95-109, 1991.

- 48-Kinoshita A, Yamada K, Hayakawa T: Wound healing following stab injury on rat cerebral cortex. *Neurol Res.* 13(3): 184-88, 1991.
- 49-Kinuta Y, Kikuchi H, Ishikawa M, Kimmura M, Itokawa Y: Lipid peroxidation in focal ischemia. *J. Neurosurg.* 71:421-9, 1989.
- 50-Kitchener PD, Bourreau JP, Diamond J: NADPH-diaphorase histochemistry identifies isolated endothelial cells at sites of traumatic injury in the adult rat brain. *Neuroscience* 53(3): 613-24, 1993.
- 51-Krum JM, Mure NS, Rosenstein JM: Brain angiogenesis: Variations in vascular basement membrane glycoprotein immunoreactivity. *Exp. Neurol.* 111(2): 152-65, 1991.
- 52-Kontos HA, Wei EP, Poulshock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellis EF: Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G₂. *Science* 209:1242-5, 1989.
- 53-Kuppner MC, Sawanura Y, Hamou MF, Tribolet N: Influence of PGE₂ and cAMP- modulating agents on human glioblastoma cell killing by interleukin-2 activated lymphocytes. *J. Neurosurg* 72: 619-625, 1990.
- 54-Leslie JB, Watkins D: Eicosanoids in the central nervous system. *J. Neurosurg.* 67:659-68, 1988.
- 55-Levasseur JE, Patterson JL, Ghatah NR, Kontos AH: Combined effect of respirator induced ventilation and superoxide dismutase in experimental brain injury. *J. Neurosurg.* 71:573-5, 1989.
- 56-Lyons MU, Anderson RE, Meyer FB: Basic fibroblast growth factor promotes in vivo cerebral angiogenesis in chronic forebrain ischemia. *Brain-Res.* 6.558(2): 315-20, 1991.
- 57-Marin-Padilla: Embryology ; In. M.G Yaşargil (Ed). *Microneurosurgery*, In 4 Volumes, Thieme Medical Publishers, Inc: pp: 23 - 44, 1987.
- 58-Mayes PA: Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids. In *Harper's biochemistry*. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Redwell VW (eds). 21st . Appleton and Lange, Middle East Edition, Libanon. Ch 25, pp 210-7, 1988.
- 59-McCord JM, Fridovich I: Superoxide Dismutase: An Enzymic Function For Erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry.* 22:6049-55, 1969.
- 60-Millong G: Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions and fixation. *J. App. Physics* 32: 1637, 1961.
- 61-Moore, Keith L: *The Developing Human-Clinically Oriented Embryology*. Third Edition. Philadelphia, W. B. Saunders Co., pp. 63-64, 1982.
- 62-Morioha T, Babu T, Black KL, Streit WS: Response of microglial cells to experimental rat glioma. *Glia.* 6(1): 75-79, 1992.
- 63-Okta H, Ishiyama J, Saito H, Wishiyama W: Effects of pretreatment with basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor and nerve growth factor on neuron survival and neovascularization. *Jpn. J. Pharmacol.* 55(2): 255-62, 1991.
- 64-Parker JE, Slater TF, Wilson RL. Direct Observation of a Free Radical Interaction Between Vitamin E and Vitamin C. *Nature.* 1979; 278:733-77. Pryor, WA. *Methods of Detecting Free Radicals*, in Bhatnagar RS. *Molecular Basis of Environmental Toxicity* Ann Arbor Science Press 1980.
- 65-Paumala M, Anderson RE, Meyer FB: Intraventricular infusion of HBGF.2 promotes cerebral angiogenesis in wistar rat. *Brain Res.* 26: 534(1-2): 283-6, 1990.
- 66-Pryor WA. *Methods of Detecting Free Radicals* in Bhatnagar RS. *Molecular Basis of Environmental Toxicity*. Ann. Arbor. Science Press. 1980.
- 67-Pryor WA. *The Role of Free Radical Reactions in Biological Systems*. Free Radicals in Biology, San Diego Academic 1976.
- 68-Reading HW. Isbir T. Action of Lithium on ATPases in Transmitter Release from Rat Iris. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 3471.

- 69-Reading HW, Isbir T. The Role of Cation-Activated ATPases in Transmitter Release From Rat Iris. *Quart J. Exper. Phys.* 1980; 65: 105.
- 70-Relton SK, Rothwell NS: Interleukin -1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain-Res-Bull.* 29(2): 243-6, 1992.
- 71-Roszman TL, Brooks WH, Elliott LH: Inhibition of lymphocyte responsiveness by a glial tumor cell-derived suppressive factor. *J. Neurosurg* 67:874-9, 1987.
- 72-Roth EF, Jr and Gilbert HS: The Pyrogallol Assay for Superoxide Dismutase: Absence of a Glutathione Artifact. *Anal. Biochem* 137:50, 1984.
- 73-Saito T, Tanaha R, Kouno M, Washiyama K, Abe S, Kumanishi T: Tumor-infiltrating lymphocytes and histocompatibility antigens in primary intracranial germinomas. *J. Neurosurgery* 70:175-82, 1989.
- 74-Saltman P. Oxidative Stress: A Radical View *Seminars in Hematology* 1980; 26:249.
- 75-Schwartz A, Lindemayer GB, Allen JC. The Sodium-potassium Adenosine Triphosphatase. *Pharmacological, Physiological and Biochemical Aspects. Pharmacol Rew* 1975; 27: 134.
- 76-Sechetti A, Lippman R, Walsh EK: Attenuation of decompressive hypoperfusion and edema by superoxide dismutase. *J. Neurosurg.* 71:578-87, 1989.
- 77-Sieves S, Struckhoff G, Puchner M: Interleukin-1-beta does not induce reactive astrogliosis, neovascularization or scar formation in the immature rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11(2): 281-93, 1993.
- 78-Skou JC. Further Investigations a $Mg^{++} - Na^{+}$ Activated Adenosine Triphosphatase, Possibly Related to the Active Linked Transport of the Na^{+}, K^{+} across the Membrane. *Biochim Biophys Acta* 1960; 42: 23.
- 79-Skou JC. Enzymatic Basis for Active Transport of Na^{+} and K^{+} Across Cell Membrane. *Physiol Rew* 1965; 45: 596.
- 80-Skou JC. The Enzymatic Basis for The Active Transport of Sodium and Potassium. *Protopl.* 1967; 63: 303.
- 81-Skou JC. The Relationship of the $(Na^{+}-K^{+})$ Activated Enzyme System to Transport of Sodium and Potassium Across Cell Membrane. *Bioenergy* 1972;4:30.
- 82-Stefan L. Superoxide Dismutase, Free Oxygen Radicals and Inflammation. *Adv. Clin. Enzymol* 1986; 4:135-144.
- 83-Stein JH, Hinder AR, Oshuizen D: Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: Protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery* 108:467-73, 1990.
- 84-Takahashi JA, Fukumito M, Igarashi K, Oda Y, Kihuchi H, Hatamaka M: Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human glioma. *J Neurosurg.* 76(5):792-8, 1992.
- 85-Vaquero J, Coca S, Magallon R, Ponton P, Martinez R: Immunohistochemical study of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphocytes of primary intracranial germinomas. *J. Neurosurg* 72:619-25, 1990.
- 86-Wakaro Y, Takei K, Kohsaka S, Takayama H, Otani M, Tshada Y, Toya S: Xenogeneic neural transplantation: role of vasculature and MHC antigen in immunological rejection. *Stereotact.- Funct. Neurosurg.* 54-55:358-63, 1990.
- 87-Zagzag D, Brem S, Robert F. Neovascularization and Tumor Growth in the Rabbit Brain. A Model for Experimental Studies of Angiogenesis and the the Blood-Brain Barrier. *American Journal of Pathology.* 131:361-72, 1988.
- 88-Zubay G: The three-Dimensional Structure of Proteins-Chapter 4, in Geoffrey Zubay, Columbia University (ed): *Biochemistry*, third edition, Wm. C. Brown Communications, Inc. pp 75-151, 1993.