



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
MANNİTOL VE CONIVAPTAN TEDAVİSİNİN
BEYİN ÖDEMİ VE NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Arş. Gör. Betül CAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özkan ALATAŞ**

2017



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
MANNİTOL VE CONIVAPTAN TEDAVİSİNİN
BEYİN ÖDEMİ VE NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Arş. Gör. Betül CAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Özkan ALATAŞ**

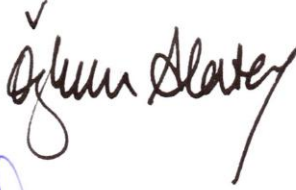
ESOGÜ BAP Proje No: 2017-1524

KABUL VE ONAY SAYFASI

Arş. Gör. Betül CAN'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Deneysel Serebral İskemi-Reperfüzyon Modelinde Mannitol ve Conivaptan Tedavisinin Beyin Ödemi ve Nöroinflamasyon Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "KABUL" edilmiştir.

04.08.2017

Üye : Prof. Dr. Özkan ALATAŞ



Üye : Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK



Üye : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



Üye : Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

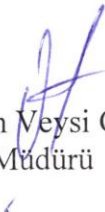


Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/08/2017 tarih ve ...136/...5518. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



Özet

Can, B. Deneysel Serebral İskemi-Reperfüzyon Modelinde Mannitol ve Conivaptan Tedavisinin Beyin Ödemi ve Nöroinflamasyon Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Doktora Tezi, Eskişehir, 2017.

Amaç ve Kapsam: Serebral kan akışının kritik eşik değerin altına düşmesi ile ortaya çıkan beyin iskemisi sırasında ve reperfüzyon sürecinde meydana gelen hücrel ve metabolik değişiklikler, beyinde geri döndürülemeyen fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Bu süreç, Kan Beyin Bariyeri yıkımı ve artan beyin ödemi ile daha da komplike hale gelmektedir. Buna eşlik eden Antidiüretik hormon salgılanmasındaki artış, beyin hasarını ve ödemi şiddetlendirmektedir. Bu nedenle, beyin ödemi inme hastalarında en yıkıcı komplikasyonlardan biridir. Beyin su içeriği yüzdesindeki küçük azalmalar dahi prognoza olumlu yönde etki gösterebilir. Bu bakımdan, özellikle akut evrede, ödemi kontrol altına alabilmek, beyin dokusunun ileri düzey hasarlardan korunmasında ve iyi klinik sonuçların bakımından büyük bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada, beyin ödemi oluşumu için uygun bir serebral iskem-reperfüzyon modeli oluşturularak; diüretik bir ajan olan Mannitol'ün ve akuaretik bir ADH reseptör antagonisti olan Conivaptan'ın, post-iskemik beyin hasarı, nöroinflamasyon ve beyin ödemi oluşumu üzerine akut dönemdeki etkileri arasındaki farklılığın araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 58 adet Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Kontrol (n=10), İskemi/Reperfüzyon (n=12), Mannitol Tedavi (n=12), Conivaptan Tedavi-1 (n=12) ve Conivaptan Tedavi-2 (n=12) olmak üzere beş grup oluşturuldu. Kontrol haricindeki tüm gruplarda, bilateral a.carotis communis 30 dakika süreyle klemplendi. Reperfüzyon ile birlikte, juguler venden ilgili gruplara 30 dakika süreyle Serum fizyolojik, Conivaptan ve Mannitol tedavisi uygulandı. Tedavi etkisi, reperfüzyondan 6 saat sonra alınan kan ve beyin dokusu örneklerinde biyokimyasal ve histolojik analizler yardımıyla değerlendirildi. Serum örneklerinde Na⁺, K⁺, Cl⁻, antidiüretik hormon, progranulin, Tümör nekroz faktör alfa, İnterlökin-15, İnterlökin-35, Nöron spesifik enolaz, Miyeloperoksidaz aktivitesi, Albumin ve Ozmolalite ölçüldü. Doku örneklerinde beyin su içeriği hesaplandı; Frontal korteks ve hipokampus kesitlerinde histolojik incelemeler için Hematoksilen-Eosin ve TUNEL boyama işlemleri uygulandı. Veri analizleri, SPSS 21.0 paket programı ile yapıldı.

Bulgular: Biyokimyasal ve histolojik bulgular doğrultusunda, iskem/reperfüzyon grubunda post-iskemik serebral hasar ve ödem meydana geldiği tespit edildi. Doza bağlı olarak Conivaptan'ın doku hasarının önlenmesi, inflamasyonun kontrollü sürdürülebilmesi ve beyin hidromineral dengesinin sağlanabilmesinde Mannitol'e göre daha etkili olabileceği görüldü.

Sonuç: Serebral iskem-reperfüzyon hasarına ve ödeme karşı, Conivaptan tedavisinin, klinikte kabul gören ancak ciddi yan etkileri olabilen Mannitol'e göre, akut dönemde doza bağlı olarak daha etkili olduğu sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: İnme, Nöroinflamasyon, Ödem, Mannitol, Conivaptan

Summary

Can, B. A Comparison of The Effects of Treatment with Mannitol and Conivaptan on Brain Edema and Neuroinflammation in an Experimental Cerebral Ischemia-Reperfusion Model. Eskisehir Osmangazi University, Institute of Medical Sciences, PhD Thesis in Biochemistry, 2017.

Objectives: The damage process occurring by below the critical threshold value of cerebral blood flow during the brain ischemia and reperfusion, the cellular and metabolic changes lead to disorders of functions which can not be recovered in the brain tissue. This process which continued with destruction of the blood brain barrier and with cerebral edema, is becoming even more complicated. It is often accompanied by the increase in the release of antidiuretic hormone. Increased levels of antidiuretic hormone can aggravate of the brain edema and injury even more. For this reason, cerebral edema is the most devastating complication in patients with stroke. The very little reductions of the percentage of the brain water content can affect to the prognosis positively. Therefore, the edema to get under control, especially in the acute stage, has a life-saving importance, to maintain the brain tissue from further damage, in point of view the good clinical outcome. In this study, it is aimed to the investigation of the possible difference between the effects of a diuretic Mannitol and an aquaretic Conivaptan, in the acute phase, on the post-ischaemic brain damage, neuroinflammation and acute edema formation, in a rat cerebral ischemia-reperfusion model for brain edema.

Materials and Methods: In the study, 58 Sprague Dawley rats were used. Five groups were formed: Control (n=10), Ischemia/Reperfusion (n=12), Mannitol Therapy (n=12), Conivaptan Therapy-1 (n=12) and Conivaptan Therapy-2 (n=12). In all groups except control, bilateral a.carotis communis was clamped for 30 minutes. Saline, Conivaptan and Mannitol treatment were applied to the relevant groups of jugular vein with reperfusion for 30 minutes. The effect of treatment was assessed by biochemical and histological analyzes in blood and brain tissue samples taken 6 hours after reperfusion. In serum samples from rats were measured Na^+ , K^+ , Cl^- , antidiuretic hormone, progranulin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-15 and interleukin-35 levels, neuron-specific enolase, myeloperoxidase activity, albumin and osmolality. In brain tissue samples was calculated the brain water content, beside hematoxyline-eosin staining and TUNEL methods by histopathological examination. Data analyse was done with the SPSS 21.0 package program.

Results: The biochemical and histological findings showed that post-ischemic cerebral damage and edema occurred in the ischemia/reperfusion group. Depending on the dose, Conivaptan was found to be more effective than Mannitol in preventing tissue damage, getting inflammation under control and providing brain hydromineral balance.

Conclusions: Against cerebral ischemia-reperfusion injury and edema, it was concluded that Conivaptan treatment was more effective than Mannitol, which is accepted clinically but has serious side effects, depending on dose in acute phase.

Key Words: Stroke, Neuroinflammation, Edema, Mannitol, Conivaptan.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET..... | iii |
| SUMMARY..... | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| TABLO DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİL DİZİNİ..... | viii |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ..... | x |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1.Serebrovasküler Sistem Anatomisi..... | 3 |
| 2.2.Beyin Bariyerleri..... | 8 |
| 2.2.1.Kan-Beyin Bariyeri..... | 10 |
| 2.2.1.1.Endotelial Hücreler..... | 11 |
| 2.2.1.2.Bazal Membran..... | 14 |
| 2.2.1.3.Nöronlar..... | 16 |
| 2.2.1.4.Astrositler..... | 16 |
| 2.2.1.5.Mikroglialar..... | 17 |
| 2.2.1.6.Oligodendrositler..... | 18 |
| 2.2.1.7.Perisitler..... | 19 |
| 2.3.Serebral İskemi..... | 21 |
| 2.3.1.İskemi ve İnme..... | 21 |
| 2.3.2.Serebral İskemi Patofizyolojisi..... | 24 |
| 2.3.3.Serebral İskemi ve İnflamasyon..... | 28 |
| 2.3.3.1.Miyeloperoksidaz..... | 29 |
| 2.3.3.2.Tümör Nekroz Faktör Alfa..... | 30 |
| 2.3.3.3.İnterlökin-15..... | 31 |
| 2.3.3.4.İnterlökin-35..... | 31 |
| 2.3.4.Serebral Hasar ve Progranulin..... | 32 |
| 2.3.5.Serebral Hasar ve Nöron spesifik enolaz..... | 33 |
| 2.4.Beyinde Klirens Sistemi..... | 34 |
| 2.5.Beyin Ödemi ve Tipleri..... | 40 |
| 2.5.1.İntrakraniyal Basınç ve Ödem..... | 47 |
| 2.5.2.Ödem Tedavisi..... | 49 |
| 2.5.2.1.Mannitol..... | 49 |
| 2.5.2.2.Antidiüretik Hormon Antagonistleri..... | 52 |
| 2.5.2.2.1.Antidiüretik Hormon ve Etki Mekanizması..... | 52 |

| | |
|--|-----|
| 2.5.2.2.1.1.Vaptanlar..... | 58 |
| 2.5.2.2.1.1.1.Conivaptan..... | 58 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER..... | 61 |
| 3.1. Kullanılan Maddeler ve Cihazlar..... | 61 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 61 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar..... | 62 |
| 3.2.YÖNTEMLER..... | 62 |
| 3.2.1. Deney Hayvanları..... | 62 |
| 3.2.2. Anestezi..... | 63 |
| 3.2.3. Gruplar..... | 63 |
| 3.2.4. Cerrahi İşlemler ve İnfüzyon..... | 64 |
| 3.2.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması..... | 64 |
| 3.2.6. Yapılan Analizler..... | 65 |
| 3.2.6.1. Serum Örneklerinde Yapılan Analizler..... | 65 |
| 3.2.6.1.1. Elektrolit (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻) Düzeylerinin Ölçümü..... | 65 |
| 3.2.6.1.2. Albümin Ölçümü..... | 65 |
| 3.2.6.1.3. Ozmolalite Ölçümü..... | 65 |
| 3.2.6.1.4. Antidiüretik Hormon Düzeylerinin Ölçümü..... | 66 |
| 3.2.6.1.5. Nöron Spesifik Enolaz Düzeylerinin Ölçümü..... | 67 |
| 3.2.6.1.6. Progranulin Düzeylerinin Ölçümü..... | 68 |
| 3.2.6.1.7. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü..... | 69 |
| 3.2.6.1.8. İnterlökin-15 Düzeylerinin Ölçümü..... | 70 |
| 3.2.6.1.9. İnterlökin-35 Düzeylerinin Ölçümü..... | 71 |
| 3.2.6.1.10. Miyeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü..... | 72 |
| 3.2.6.2.Doku Örneklerinde Yapılan Analizler..... | 73 |
| 3.2.6.2.1. Beyin Ödeminin Tespiti..... | 73 |
| 3.2.6.2.2. Histolojik Analizler..... | 73 |
| 3.2.7.İstatistiksel Analiz..... | 73 |
| 4.BULGULAR..... | 75 |
| 4.1. Serum Örneklerine Ait Bulgular..... | 75 |
| 4.2. Doku Örneklerine Ait Bulgular..... | 93 |
| 5.TARTIŞMA..... | 111 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 129 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 130 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 149 |

TABLO DİZİNİ

| | |
|---|-----|
| Tablo 2.1. Aortik Arkın Dalları ve Beyin Dolaşımı..... | 7 |
| Tablo 2.2. MSS İskemik Hasarına Katılan Süreçler..... | 27 |
| Tablo 2.3. Beyindeki Klirens sistemleri..... | 39 |
| Tablo 2.4. Akuairetik ve diüretiklerin farkları..... | 55 |
| Tablo 2.5. ADH reseptör antagonistleri..... | 57 |
| Tablo 2.6. Bazı ADH V ₂ reseptör antagonistlerinin özellikleri..... | 58 |
| Tablo 2.7. Beyin Ödeminde ADH Antagonizmasına İlişkin Çalışmalar..... | 60 |
| Tablo 3.1. Sıçan Antidiüretik Hormon ELISA Kiti Deney Prosedürü..... | 66 |
| Tablo 3.2. Sıçan Nöron Spesifik Enolaz ELISA Kiti Deney Prosedürü..... | 67 |
| Tablo 3.3. Sıçan Granulin ELISA Kiti Deney Prosedürü..... | 68 |
| Tablo 3.4. Sıçan TNF- α ELISA Kiti Deney Prosedürü..... | 69 |
| Tablo 3.5. Sıçan IL-15 ELISA Kiti Deney Prosedürü..... | 70 |
| Tablo 3.6. Sıçan IL-35 Kiti Deney Prosedürü..... | 71 |
| Tablo 3.7. Hematoksilen-Eozin boyama yönteminin basamakları..... | 74 |
| Tablo 3.8. TUNEL boyama yönteminin basamakları..... | 74 |
| Tablo 4.1. Serum sodyum düzeyleri..... | 75 |
| Tablo 4.2. Serum potasyum düzeyleri..... | 77 |
| Tablo 4.3. Serum Klorür düzeyleri..... | 77 |
| Tablo 4.4. Serum albümin düzeyleri..... | 79 |
| Tablo 4.5. Serum ozmolalitesi..... | 79 |
| Tablo 4.6. Serum ADH düzeyleri..... | 81 |
| Tablo 4.7. Serum NSE düzeyleri..... | 83 |
| Tablo 4.8. Serum Progranulin düzeyleri..... | 85 |
| Tablo 4.9. Serum TNF- α düzeyleri..... | 87 |
| Tablo 4.10. Serum IL-15 düzeyleri..... | 89 |
| Tablo 4.11. Serum IL-35 düzeyleri..... | 91 |
| Tablo 4.12. Serum MPO aktivitesi..... | 93 |
| Tablo 4.13. Beyin su içeriği düzeyleri..... | 93 |
| Tablo 4.14. Çalışma Verilerinin Özeti..... | 110 |

ŞEKİL DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Karotis, vertebral ve intrakraniyal arterler..... | 4 |
| Şekil 2.2. Willis Poligonu..... | 5 |
| Şekil 2.3. Beyinde bariyer arayüzey bölgeleri..... | 8 |
| Şekil 2.4. Nörovasküler birimin yapısı..... | 10 |
| Şekil 2.5. KBB'nin anatomik yapısı..... | 11 |
| Şekil 2.6. Kan-beyin bariyerinden transport yolları..... | 14 |
| Şekil 2.7. Klinikte akut iskemik inme tanısına uygulanan protokol..... | 23 |
| Şekil 2.8. Serebral damar oklüzyonu ve reperfüzyon sonrası gerçekleşen temel olaylar..... | 26 |
| Şekil 2.9. Gilenfatik modelin önceki modellerden farklılıkları..... | 37 |
| Şekil 2.10. Serebral Kan Akımında Basınç-Hacim İlişkisi..... | 48 |
| Şekil 2.11. ADH'nin hücresel etkileri ve antagonizm mekanizması..... | 54 |
| Şekil 2.12. Conivaptan'ın kimyasal yapısı..... | 59 |
| Şekil 4.1. Serum sodyum düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 76 |
| Şekil 4.2. Serum klorür düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 78 |
| Şekil 4.3. Serum ozmolalitesine ait Histogram grafiği..... | 80 |
| Şekil 4.4. Serum ADH düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 82 |
| Şekil 4.5. Serum NSE düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 84 |
| Şekil 4.6. Serum Progranulin düzeylerine ait Kutu grafiği..... | 86 |
| Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 88 |
| Şekil 4.8. Serum IL-15 düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 90 |
| Şekil 4.9. Serum IL-35 düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 92 |
| Şekil 4.10. Beyin su içeriği düzeylerine ait Histogram grafiği..... | 94 |
| Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 95 |
| Şekil 4.12. İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 96 |
| Şekil 4.13. Mannitol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 97 |
| Şekil 4.14. 10 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 98 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Şekil 4.15. | 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 99 |
| Şekil 4.16. | Kontrol grubuna ait sıçan beyin kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 100 |
| Şekil 4.17. | Kontrol grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 101 |
| Şekil 4.18. | İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 101 |
| Şekil 4.19. | Mannitol grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 102 |
| Şekil 4.20. | 10 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 102 |
| Şekil 4.21. | 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 103 |
| Şekil 4.22. | Kontrol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 104 |
| Şekil 4.23. | İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 105 |
| Şekil 4.24. | Mannitol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 106 |
| Şekil 4.25. | 10 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 107 |
| Şekil 4.26. | 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 108 |
| Şekil 4.27. | İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri..... | 109 |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| ACTH | : | Adrenokortikotropik hormon |
| ADH | : | Antidiüretik Hormon |
| AJ | : | Adezyon Bağlantısı |
| AMPA | : | α -Amino-3-Hidroksi-5-Metilizoksazol-4-Propiyonik Asit |
| AQP | : | Akuaporin |
| BOS | : | Beyin Omurilik Sıvısı |
| COX2 | : | Siklooksijenaz-2 |
| ELISA | : | Enzim-Bağlı İmmun-Sorbent Testi |
| GFAP | : | Glial Fibriler Asidik Protein |
| GİA | : | Geçici İskemik Atak |
| GLT | : | Glutamat Transporter |
| GGT | : | Gama Glutamil Transpeptidaz |
| HE | : | Hematoksilen-Eosin |
| İKB | : | İntrakraniyal Basınç |
| IL-1β | : | İnterlökin-1 β |
| IL-15 | : | İnterlökin-15 |
| IL-35 | : | İnterlökin-35 |
| IP3 | : | İnozitol-1,4,5-Trifosfat |
| iNOS | : | İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz |
| İSS | : | İnterstisyel Sıvı |
| KBB | : | Kan-Beyin Bariyeri |
| MCA | : | Orta Serebral Arter |
| MCAO | : | Orta Serebral Arter Oklüzyonu |
| MMP | : | Matriks Metalloproteinaz |
| MSS | : | Merkezi Sinir Sistemi |
| NHE | : | Na ⁺ /H ⁺ Değiştirici |
| NKCC1 | : | Na ⁺ /K ⁺ / Cl ⁻ -Kotransporter |
| NMDA | : | N-Metil-D-Aspartat |
| NO | : | Nitrik Oksit |
| OEF | : | Oksijen Ekstraksiyon Fraksiyonu |
| OPC | : | Oligodendrosit Prekürsör Hücre |
| PBS | : | Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi |
| PGP | : | P-Glikoprotein |
| SLC | : | Çözünen Madde Taşıyıcısı |
| α-SMA | : | Alfa-Düz Kas Aktini |
| TdT | : | Terminal Deoksinükleotidil Transferaz |
| TEER | : | Transendotelial Elektriksel Direnç |
| TJ | : | Sıkı Bağlantılar |
| TNF | : | Tümör Nekroz Faktör |
| TPA | : | Doku Plazminojen Aktivatörü |

1- GİRİŞ VE AMAÇ

İnme, merkezi sinir sisteminde iskemi ya da hemorajinin neden olduğu, fokal veya global serebral fonksiyon kaybına yol açan akut nörolojik bir disfonksiyondur. Klinikte uygulanan mevcut yöntemlerle tedavi edildiğinde dahi hastalarda değişen düzeylerde sekeller kalmasına yol açan İskemik inmede, etkilenen alanın tekrar kanlanmasını sağlamak için uygulanan serebrovasküler rekanalizasyon işlemlerinin başarısı hayati öneme sahip olmakla birlikte, sonrasındaki hasar büyüklüğünün iskemiye nazaran daha fazla olduğu bilinmektedir.

Serebral kan akışının kritik eşik değer altına düşmesi ile ortaya çıkan beyin iskemisi ve sonrasındaki reperfüzyon sürecinde meydana gelen hücresel ve metabolik değişiklikler, beyin ve ekstraserebral dokularda geri döndürülemez fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Bu süreç, kan beyin bariyeri yıkımının devam etmesi ve artan kafa içi basıncının da dahil olduğu beyin ödemi ile daha da komplike hale gelmektedir. Buna sıklıkla, su homeostazını sağlayan nöropeptid bir hormon olan Antidiüretik hormon salgılamasında artış eşlik etmektedir (Zhao vd., 2015). Artan düzeydeki antidiüretik hormon, reseptörleri aracılığıyla vazospazmı, trombosit agregasyonunu ve hiponatremiyi tetikleyerek, beyin hasarını ve ödemi daha da şiddetlendirmektedir (Thibonnier, Coles, Thibonnier, & Shoham, 2001).

Beyin dokusunun volümetrik büyümesine neden olan ve beyin parenkimindeki anormal düzeyde sıvı birikimi olarak tanımlanan beyin ödemi, hasarlı bölgedeki mikro-dolaşımda kompresyona yol açmaktadır. Perifokal bölgede doku basıncında artma ve kan dolaşımında ise azalma meydana gelmektedir. Ödem yüksek düzeyde olduğunda intrakranial basınç da artarak, ileri evrelerde herniasyon ve beyin sapı kanamalarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, beyin ödemi, inme hastalarında en yıkıcı komplikasyonlardan biridir. Beyin hacmi su içeriği açısından geometrik bir fonksiyon gösterdiği için, beyin su içeriği yüzdesindeki çok küçük azalmalar bile oldukça büyük değişiklikler oluşturarak prognoza olumlu yönde etki gösterebilmektedir. Bu nedenle makro- ve mikro-sirkülasyondaki değişimlerin normal fizyolojik koşullar altında tutulabilmesi için, özellikle akut evrede, ödemi ve dolayısıyla kafa içi basıncı kontrol altına alabilmek, beyin dokusunun daha ileri düzey hasarlardan ve komplikasyonlardan korunmasında, özellikle tedavi süresi, verimliliği ve klinik sonuçları açısından hayat kurtarıcı nitelikte büyük bir önem taşımaktadır.

Antidiüretik hormon reseptörlerinin bloke edilmesi amacıyla son yıllarda üretilen yeni bir ilaç grubu olan Vaptanlar, peptid yapıda olmayan ADH reseptör antagonistleridir. Conivaptan, FDA tarafından 2005 yılında klinikte

yatan hiponatremi tanısı olan hastaların intravenöz tedavisi için onay alan akuaretik bir ajandır. Conivaptan ADH'nin reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanarak, elektrolit atılımında önemli bir değişiklik yapmadan, renal serbest su atılımını artırmaktadır (Palmer, Rock & Woodward, 2016). Bu tür ADH reseptör antagonistlerinin reperfüzyon sırasında kullanımının, post-iskemik kan beyin bariyeri yıkımını ve beyin ödemi minimize ederek hastalığın progresyonunu önlemesi, iyileşme sürecini hızlandırarak olası sekel düzeyini en aza indirmesi, dolayısıyla prognoz üzerine olumlu yönde etkisi günümüzde netlik kazanmamıştır ve bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Zeynalov vd., 2015).

Bu çalışmada, klinik vakalardaki beyin ödemi oluşumu için uygun bir serebral iske mi-reperfüzyon modeli oluşturularak; diüretik bir ajan olan Mannitol ve yeni bir akuaretik ADH reseptör antagonisti olan Conivaptan'ın, beyin dokusunda var olan ve de ekstraserebral dokulardan kaynaklanan inflamatuvar etkenlerin neden olduğu post-iskemik beyin hasarı, nöroinflamasyon ve beyin ödemi oluşumu üzerine akut dönemdeki etkileri arasındaki olası farklılığın araştırılması amaçlanmıştır.

Conivaptan'ın, klinikte kabul gören ancak böbrek yetmezliği, asit-baz dengesinin bozulması, solunum depresyonu ve hipovolemi gibi çeşitli yan etkileri olduğu bilinen Mannitol'e göre daha olumlu etkiye ve niteliğe sahip olup olmadığı araştırılmak üzere, reperfüzyon ile birlikte sıçanlara uygulanan intravenöz Conivaptan ve Mannitol tedavisinin etkileri, alınan kan ve doku örneklerinde yapılan bazı biyokimyasal testler ve histolojik incelemeler yardımıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Akut iske mi reperfüzyon sıçan modelinde uygulanan beyin ödemi tedavi sürecinden elde edilen bulguların, klinikte akut iske mik inme ve inmenin eşlik ettiği bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavi stratejilerinin planlanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2- GENEL BİLGİLER

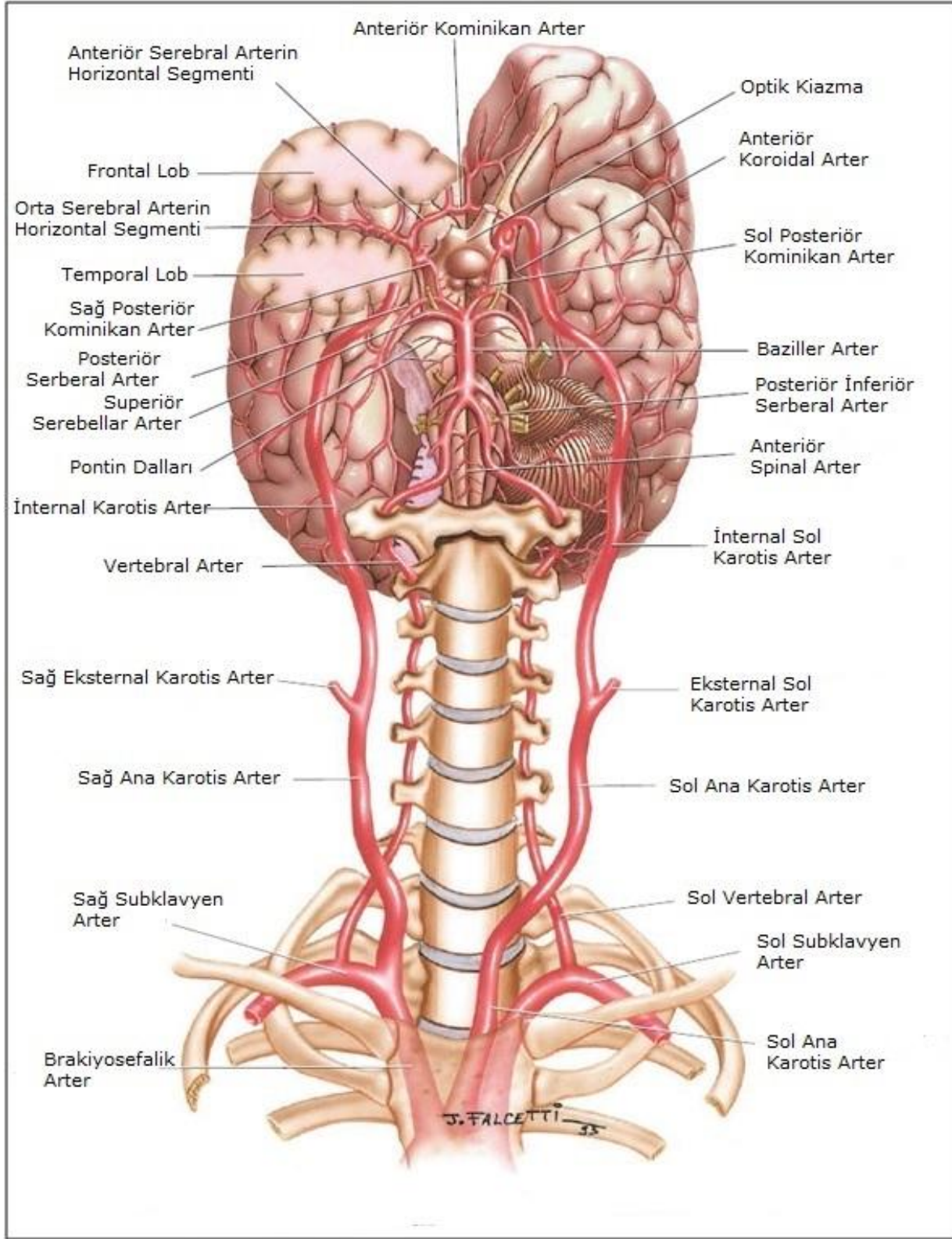
2.1 - Serebrovasküler Sistem Anatomisi

Baş ve boynun arteriyel vaskülarizasyonu, aortik arktaki *Brakiyosefalik Arter*, *Sol Karotis Arter* ve *Sol Subklavyen Arter* olarak adlandırılan üç ana arter tarafından sağlanmaktadır; her biri kalbe yakınlığına bağlı olarak, elastik arter sınıfına dahil edilmiştir (Uflacker, 2007). Vücudun yalnızca sağ tarafında bulunan Brakiyosefalik arter *Sağ Subklavyen Arter*'e ve *Sağ Ana Karotis Arter*'e dallanır. Sol Subklavyen Arter ve Sol Karotis Arter, aortik arktan bağımsız olarak çıkar, ancak sağdaki eş arterlere benzer bir yapı ve dağılım gösterir (College, 2013) (Şekil 2.1).

Subklavyen arterlerin her biri kol, göğüs, omuz, sırt ve merkezi sinir sistemine kan akışı sağlamakta; *İnternal Torasik Arter*, *Tiroservikal Arter* ve *Vertebral Arter* olarak adlandırılan üç büyük dalı oluşturmaktadır. İnternal torasik arter (meme arteri) timus, kalp perikardı ve ön göğüs duvarına; Tiroservikal arter ise tiroid, boynun servikal bölgesi, sırtın üst kısmı ve omuzlara kan akışı sağlamaktadır (College, 2013). Subklavyen arterden tiroservikal trunkus hizasında çıkan vertebral arterler ise, üst 6 servikal vertebranın transvers foraminalleri içinde yukarı doğru seyrederek *Atlas* (1. Boyun Omuru)'ın arkasına doğru kıvrım yapar; beyne ve omuriliğe kan ulaştırmak üzere Foramen magnum yoluyla kraniuma girer. Medulla'nın ventrolateralinde seyrederek ponsun ön yüzünde orta hat üzerinde yer alan baziller sulkusun kaudal ucunda, her iki vertebral arter birleşerek geniş *Baziller Arter*'i oluştururlar (Güler, Çiftçi & Şirin, 2016).

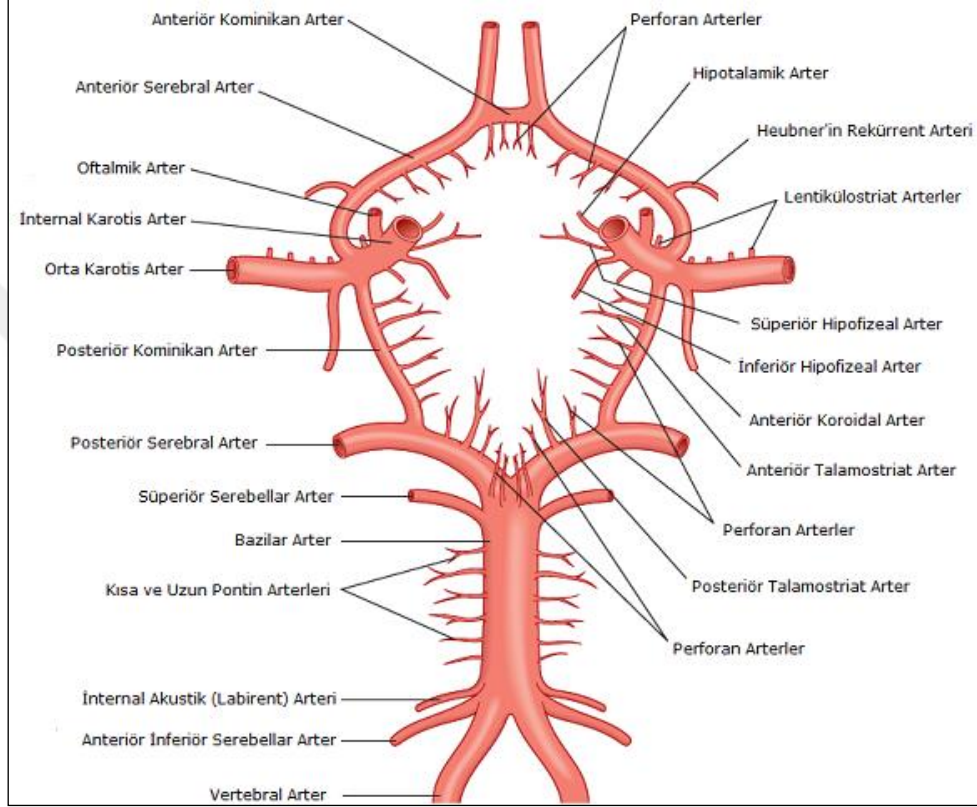
Baziller arter, iki vertebral arterin birleşiminde başlayan, serebellum ve beyin sapına dallar gönderen bir anastomozdur (College, 2013). Bu arter, rostrale doğru ilerleyerek, rostral uçta sağ ve sol *Posterior Serebral Arter*'leri oluşturmak üzere ikiye ayrılır; uzun ve kısa sirkumferensiyel ve perforan dalları verir (Güler, 2016; Kutluk, 2004).

Sağ Ana Karotis Arter, tiroid kartilaj seviyesinde *Sağ İnternal Karotis Arter* ve *Sağ Eksternal Karotis Arter* dallarına ayrılır. Sol Ana Karotis Arter ise aortik arkın apeksinden çıkarak, *Sol İnternal* ve *Sol Eksternal Karotis Arter* dallarını verir (Güler, 2016). Eksternal karotis arter yüz, alt çene, boyun, özofagus ve larinksteki birçok yapıya kan sağlamak üzere dallara ayrılır. Bu dallar dil, yüz, oksipital, maksiller ve yüzeysel temporal arterleri kapsar. İnternal karotis arter, başlangıç kısmında karotis baroreseptörlerini ve kemoreseptörlerini içeren, *Karotis Sinüs* olarak adlandırılan bir genişleme oluşturur. Buradaki reseptörler tarafından sağlanan bilgiler, kardiyovasküler homeostazın korunmasında büyük önem taşımaktadır (College, 2013).



Şekil 2.1. Karotis, vertebral ve intrakraniyal arterler (Uflacker, 2007).

Beynin kaidesinde sağ ve sol karotis sistemler hem birbirleriyle hem de vertebrobaziller sistemle bağlantılı arterlerden oluşan, *Willis Poligonu* olarak bilinen bir anastomoz yapı oluştururlar (Ökten & Güzel, 2012; College, 2013) (Şekil 2.2). Serebruma giren kanın hepsi öncelikle Willis poligonu'ndan geçer.



Şekil-2.2. Willis Poligonu (Silverman, 2009).

İnternal karotis arter, temporal kemiğin karotis kanalı boyunca devam eder, karotis foramen vasıtasıyla beyin tabanına girerek, burada birkaç dal oluşturur. Bu dallardan biri, serebrumun frontal lobuna kan sağlayan *Anteriör Serebral Arter*'dir. Bir başka dal olan *Orta Serebral Arter*, serebrovasküler olayın en sık görüldüğü yerler olan temporal ve pariyetal loblara; üçüncü büyük dal olan *Oftalmik Arter* ise gözlere kan taşır (College, 2013).

Sağ ve sol Anterior Serebral Arterler, *Anteriör Komünikan Arter* denilen bir anastomoz oluşturacak şekilde birleşirler. Anteriör serebral arterlerin ve Anteriör Komünikan Arter'in başlangıç segmentleri, Willis poligonu'nun anterior kısmını oluşturur. Willis poligonu'nun posterior kısmını ise, baziler arterden çıkan *Posteriör Serebral Arter*'den dallanan bir sağ ve bir sol *Posteriör Komünikan Arter* oluşturur. Bu arter, serebrum ve beyin sapının posterior kısmına kan sağlar.

Willis poligonu'nun oluşumuna katılan arterler: Bilateral İnternal Karotis Arter, Bilateral Anteriör Serebral Arter'in horizontal (A1) segmentleri, Anteriör Komünikan Arter, Bilateral Posteriyör Komünikan Arter, Bilateral Posteriyör Serebral Arter'in horizontal (P1) Segmentleri ve Baziler Arter Bifurkasyonu'dur (Ökten & Güzel, 2012).

Böylece ana damarlar ve bunların küçük penetran arterleri yoluyla beyin tamamı kanlandırılmaktadır (Kutluk, 2004) (Tablo 2.1). Beyin kapillerinden gelen kan ise, dura materin arasında yer alan geniş venöz sinüslere akarak, kafatasının altında ve boynun her iki tarafında internal jugular venlere boşalır; buradan da brakioyosefalik venlere geçer. Sağ ve sol brakioyosefalik venler birleşerek *Superior Vena Kava*'yı oluşturur ve kalbin sağ atriumuna gelir (Aktümsek, 2015).

Anastomoz noktalarında perfüzyon basıncı normalde sıfırdır; yani, vasküler sistemin fizyolojik işleyişi sırasında iki sistemin kanı birbirine karışmaz. Vertebrobaziler sistem posterior fossa yapılarını beslerken, karotis sistem beyin geri kalan bölümünü kanlandırmaktadır. Patolojik koşullarda, örneğin Willis poligonuna katılan arterlerden birinde tıkanma meydana gelirse, anastomoz bölgesinin basıncında ortaya çıkan değişiklikler nedeniyle, Willis poligonu ön ve arka ya da sağ ve sol sistemler arasında bir köprü görevi üstlenerek, birleştirici arterler kanalıyla, kanı normal yataktan tıkanma noktasının distaline doğru taşımaktadır. Ancak bu kollateral dolaşım her koşulda kurtarıcı olmayıp, bireyler arası önemli varyasyonlar söz konusudur. Çok akut bir tıkanmada ise yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda tıkanan arterin sulama alanında, o bölgeye özgü fokal nörolojik disfonksiyona yol açan bir iskemik lezyon (infarkt) meydana gelebilmektedir (Kutluk, 2004).

Beyin dokusu membran potansiyellerinin korunması, nörotransmitter sentezi ve depolanması, bozulan yapısal kısımların yenilenmesi gibi işlevleriyle oldukça aktif olması nedeniyle, diğer organlara göre daha yüksek miktarda oksijene ve enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Beyne kan akışı belirgin bir şekilde sabittir; beyin herhangi bir zamanda kardiyak debinin yaklaşık % 20'sini ve toplam oksijenin ise yaklaşık % 25'ini kullanmaktadır (Şahan, Satar, Koç & Sebe, 2010). Beynin vücuttaki merkezi rolü ve önemi göz önüne alındığında, bu organa internal karotis arterler ve vertebral arterler ile kan akışının aralıksız olarak devam etmesi hayati öneme sahiptir. Kan akışı kesildiğinde, sadece birkaç saniye dahi olsa, *Geçici İskemik Atak* meydana gelebilir, bilinç kaybına veya geçici nörolojik fonksiyon kayıplarına neden olabilir. Bazı durumlarda hasar kalıcı da olabilmektedir. Genellikle 3-4 dakika ve daha uzun süren kan akışı kaybı, geri dönüşümsüz bir beyin hasarı veya Serebrovasküler Olay olarak da adlandırılan *İnme*'ye neden olmaktadır (College, 2013).

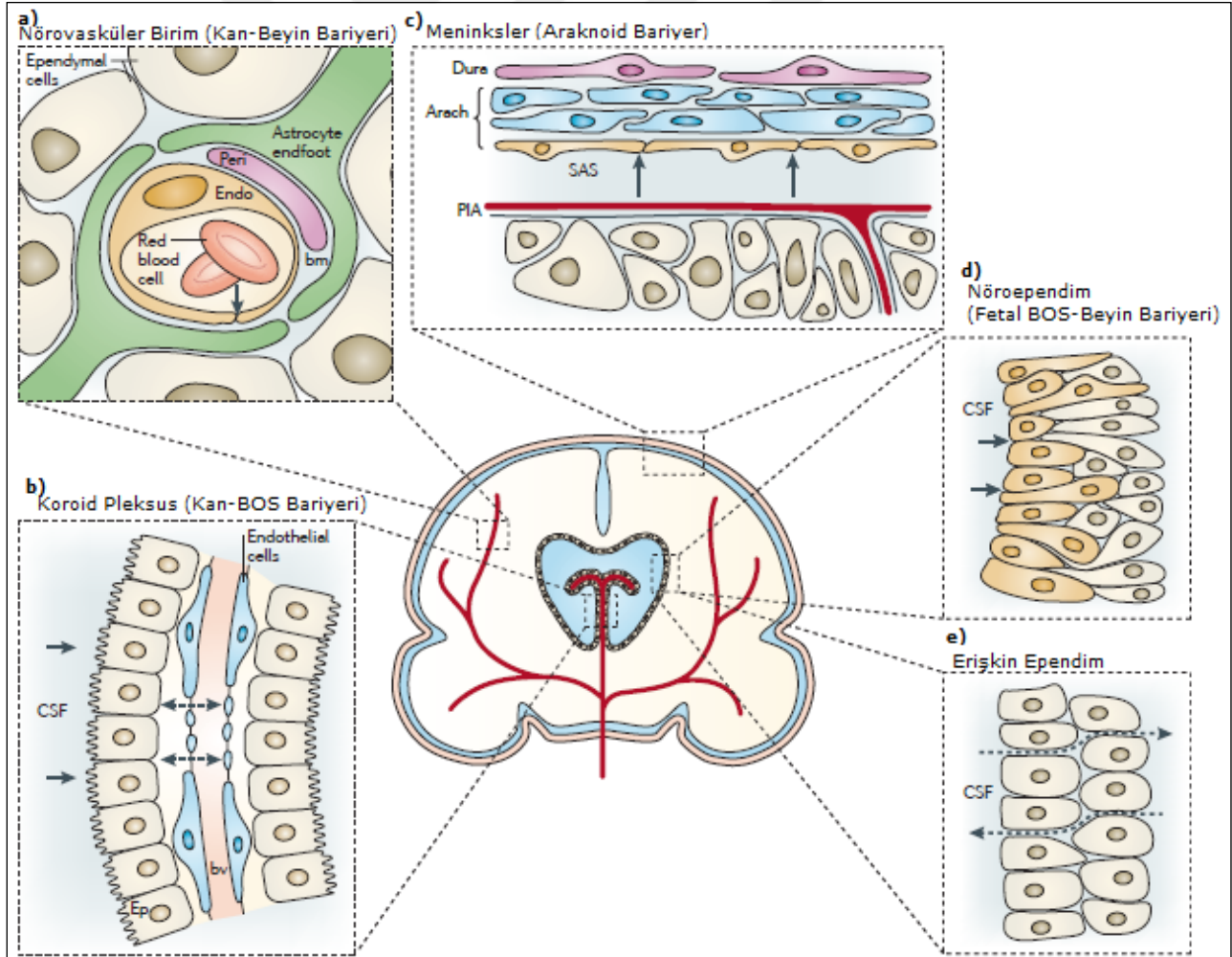
Tablo 2.1. Aortik Arkin Dalları ve Beyin Dolaşımı (College, 2013)

| Damarlar | Özellikleri |
|-----------------------------|---|
| Brakiosefalik Arter | Vücutun sağ tarafında bulunan tek damardır. Aortik arkta dallanan ilk damardır. Sağ subklavyen arter ve sağ ana karotis arteri verir. Baş, boyun, üst ekstremiteler ve torasik bölgenin duvarına kan sağlar. |
| Subklavyen Arter | Sağ subklavyen arter, brakiosefalik arterden, sol subklavyen arter ise aortik arkta oluşur. İnternal torasik, vertebral ve tiroservikal arterleri verir. Kollar, göğüs, omuz, sırt ve merkezi sinir sistemine kan sağlar. |
| İnternal Torasik Arter | Meme arteri de denir. Subklavyen arterden oluşur. Timus, kalpteki perikard ve anterior göğüs duvarına kan sağlar. |
| Vertebral Arter | Subklavyen arterden oluşur ve vertebral foramen üzerinden foramen magnum yoluyla beyine geçer. Willis poligonunu oluşturmak üzere internal karotis artere bağlanır. Beyne ve omuriliğe kan sağlar. |
| Tiroservikal Arter | Subklavyen arterden oluşur. Tiroid, servikal bölge, sırt üstü ve omuza kan sağlar. |
| Ana Karotis Arter | Sağ ana karotis arter brakiosefalik arterden ve sol ana karotis arter ise aortik arkta oluşur. Her biri internal ve eksternal karotis arterleri verir. Baş ve boyunun ilgili yanlarını besler. |
| Eksternal Karotis Arter | Ana karotis arterden oluşur. Yüz, alt çene, boyun, özofagus ve larinksdeki birçok yapıya kan sağlar. |
| İnternal Karotis Arter | Ana karotis arterden oluşur ve karotis sinüsü ile başlar. Temporal kemiğin karotis kanalı üzerinden beyin tabanına geçer. Willis poligonunu oluşturan vertebral arterin dallarıyla birleşir. Beyne kan sağlar. |
| Willis Poligonu | Beynin tabanında bulunan sürekli kan desteği sağlayan bir anastomozdur. İnternal karotis ve vertebral arterlerin dallarından oluşur. Beyne kan sağlar. |
| Anteriör Serebral Arter | İnternal karotis arterden oluşur. Serebrumun frontal lobuna kan sağlar. |
| Orta Serebral Arter | İnternal karotis arterin bir diğer dalıdır. Serebrumun temporal ve parietal loblarına kan sağlar. |
| Oftalmik Arter | İnternal karotis arterin dalıdır. Gözlere kan sağlar. |
| Anteriör Kominikans Arter | Sağ ve sol internal karotis arterlerin anastomozudur. Beyne kan sağlar. |
| Posteriyör Kominikans Arter | Willis poligonunun posteriyör kısmının bir parçasını oluşturan posterior serebral arterin dallarıdır. Beyne kan sağlar. |
| Posteriyör Serebral Arter | Willis poligonunun posteriyör segmentinin bir kısmını oluşturan baziler arterin dalıdır. Beyin ve beyin sapının posteriyör kısmına kan sağlar. |
| Baziler Arter | İki vertebral arterin birleşmesinden oluşur. Beyincik, beyin sapı ve posteriyör serebral arterlere dallar gönderir. Beyin sapının ana kan kaynağıdır. |

2.2 - Beyin Bariyerleri

Merkezi sinir sisteminde nöronlar, kimyasal ve elektriksel sinyaller yoluyla iletişim kurmaktadır; bu nedenle sağlıklı bir nöral sinyalizasyon için sinaps ve aksonların lokal iyonik mikroçevresinde hassas bir regülasyon söz konusudur. Bu regülasyonda, kan ve nöral doku arasında yer alan arayüzeylerdeki bariyer tabakaları önemli role sahiptir (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof & Begley, 2010).

Yetişkin ve gelişmekte olan beyinde kan, nöral doku ve dokunun sıvı içeren boşlukları arasında moleküler değişimleri kontrol eden ve sınırlandıran 6 arayüzey bulunduğu belirtilmektedir. Bu arayüzeyler Kan-Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) Bariyeri, Meningeal Bariyer, Sirkumventriküler Organlar, Erişkin Beyin Ependimi, Fetal Nöroependim ve Kan-Beyin Bariyeri (KBB) olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.3) (Saunders, Ek, Habgood & Dziegielewska, 2008).



Şekil 2.3. Beyinde bariyer arayüzey bölgeleri (Neuwelt vd., 2011; Saunders vd., 2008).

Kan-BOS Bariyeri, beynin 3. ve 4. ventrikülü ve lateraldeki *Koroid Pleksus*'ta bulunur; toplam yüzey alanı insanlarda KBB'nin yaklaşık %10'u kadardır (Abbott vd., 2010). Diğer serebral kan damarlarının aksine, koroid pleksus kan damarlarını oluşturan endotelial hücreler fenestralara sahiptir, bir bariyer teşkil etmezler; bariyer oluşturan hücreler, apikal bölgede sıkı bağlantıları bulunan epiteliyal hücrelerdir. Koroid pleksus hücreleri apikal bölgelerinde internal BOS alış-veriş yüzeylerini arttıran mikrovillus yapılarına sahiptir (Engelhardt & Sorokin, 2009).

Meningeal Bariyer, tüm beyin bariyerlerinin yapısal olarak en kompleksi olup, meninkslerde (pia, araknoid, dura mater) yer alır. Bariyer oluşturan hücreler, araknoid membranın dış tabakasıdır. Subaraknoid boşluktaki kan damarları, serebral kan damarlarına benzer bariyer özellikleri olan sıkı bağlantılara sahiptir (Neuwelt vd., 2011), ancak damarların çevresinde perisit ve astrosit uç-ayakları bulunmaz. Aksine, dura materdeki kan damarları fenestralara sahiptir. Bariyerin diğer önemli bileşenleri Bazal Membran ile astrosit uzantılarından oluşan *Glia limitans*'tır (Saunders vd., 2008).

Sirkumventriküler Organlar median eminens, pineal bez, area postrema ve subfornikal organı kapsar. Kan damarları, vücutta diğer damarlara benzer permeabilite özelliklerine sahiptir ve hipotalamik-hipofizer eksen tarafından kontrol edilen peptit hormonlarının geri-bildirim penetrasyonunu mümkün kılan işlevsel özelliğe sahiptir. Bu peptit ve diğer moleküllerin, bu beyin bölgelerinin apeksleri arasında sıkı bağlantılarla bağlı özelleşmiş ependimal hücreler olan tanisitler tarafından BOS'a girmesi engellenir. Beynin geri kalan kısmına giriş, astroglial hücreler arasındaki sıkı bağlantılarla önlenir (Saunders vd., 2008).

Erişkin Beyninde Ependima: Özelleşmiş tanisitlerin bulunduğu alanların yanı sıra, ependimal hücreler, BOS ve beyne ait boşluk arasında proteinler gibi büyük moleküllerin alış-verişini kısıtlamayan gap bağlantılarıyla birbirine bağlıdır (Saunders vd., 2008).

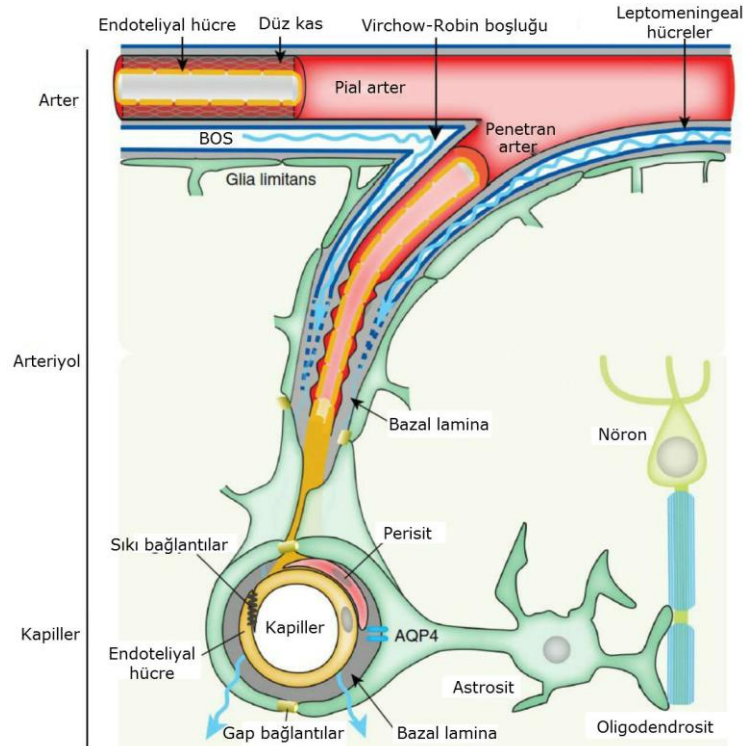
Fetal nöroependim (Embriyonik BOS-beyin bariyeri): Ventriküler alanda BOS ve beyin parenkimi arasında geçici bir bariyer bulunur. Erken beyin gelişiminde, bitişik nöroepitelyal hücreler arasında "strap" bağlantıları bulunur. Bunların küçük moleküller için değil, proteinler gibi daha büyük moleküllerin hareketini kısıtlayan fiziksel bir bariyer oluşturduğu düşünülmektedir (Neuwelt vd., 2011). Gelişimin ilerleyen aşamalarında ve yetişkin beyinde, bu arayüzey ependim haline geldiğinde, strap bağlantıları artık mevcut değildir (Saunders vd., 2008).

2.2.1. Kan-beyin bariyeri

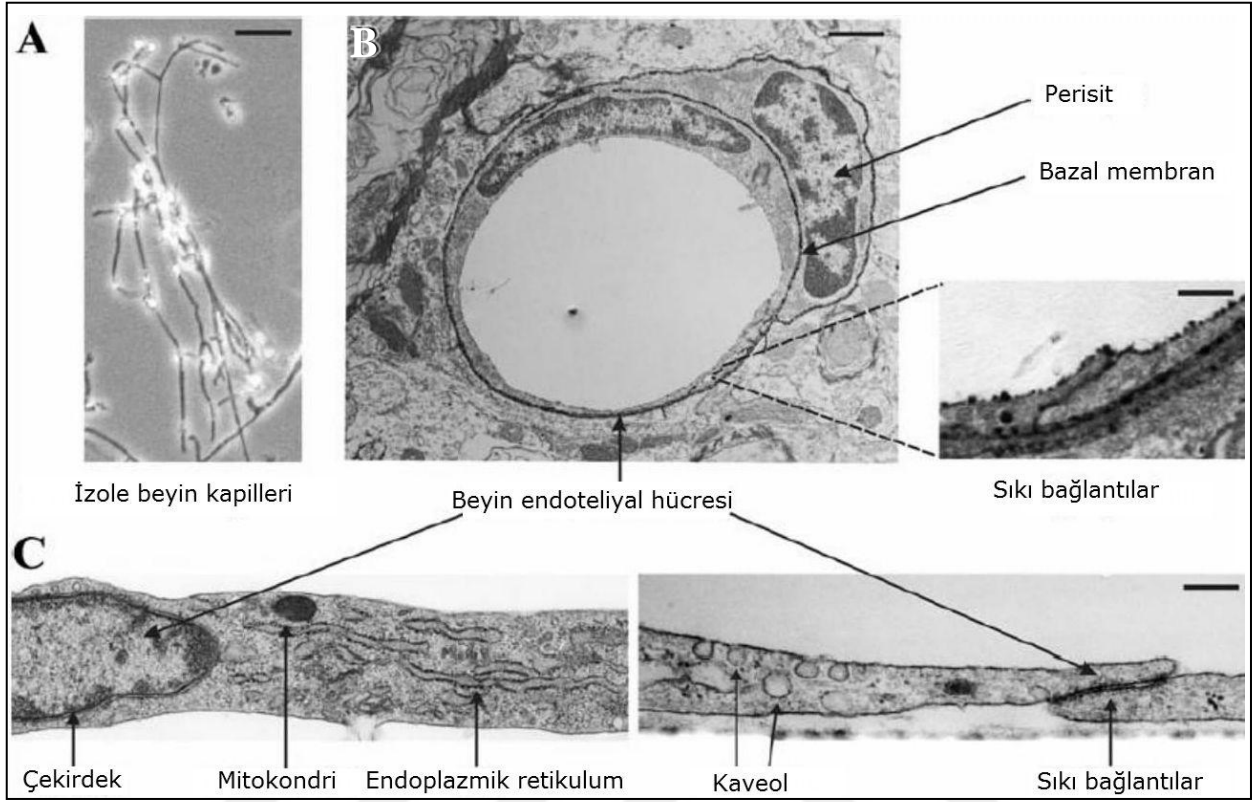
Kan-Beyin Bariyeri, kan ile beyin arasındaki karmaşık ve dinamik bir arabirimdir ve beyin interstisyumunu serebral damar sisteminin lümenal içeriğinden ayıran bir hücre kompleksini ifade eder (Stokum, Gerzanich & Simard, 2016).

KBB, sıkı bağlantılar yoluyla serebral kapiller endotel hücreleri düzeyinde oluşturulan bir bariyerdir. Yetişkin insanlarda 12-18 m² arasında bir yüzey alanına sahiptir. Beyin hücreleri kapillerden 25 µm'den daha kısa mesafede bulunduğu için, ilaçların beyin dokusunun tüm hücrelerine global olarak ulaştırılmasında KBB uygun bir yol olarak görülmektedir (Abbott vd., 2010).

KBB'nin bileşenleri ile beyin parenkiminde yer alan hücreler arasındaki iletişimi yansıtmak için *Nörovasküler Birim* terimi kullanılmaktadır (Jessen, Munk, Lundgaard & Nedergaard, 2015) (Şekil 2.4). Nörovasküler birim, bazal lamina ile çevrili kapiller endotel hücreleri, astrositik perivasküler uç ayaklar, perisitler, nöronlar, mikroglial hücreler ve düz kas hücrelerinden oluşur (Şekil 2.5); nöronal aktiviteye göre hemodinamik yanıtların tetiklenmesi, nöronal metabolizmayı destekleyen besin akışının düzenlenmesi ve nöronal yeniden biçimlenmenin modülasyonu gibi işlevleri olan bir sistemdir (Stokum vd., 2016).



Şekil 2.4. Nörovasküler birimin yapısı (Jessen vd., 2015).



Şekil 2.5. KBB'nin anatomik yapısı. A) İzole sıçan beyninin faz kontrast mikroskobu görüntüsü; B) Sıçan beynindeki kapillerin enine kesitinin transmisyon elektron mikroskop görüntüleri; C) kültürde sıçan beyin endotelial hücrelerinin ultra yapısının elektron mikroskop görüntüleri. ER, endoplazmik retikulum. Barlar A: 20 µm; B: 1 µm; Küçük şekil: 500 nm; C: 500 nm (Veszeka, Kittel & Deli, 2011).

2.2.1.1. Endotelial hücreler

Kan ve beyin arasındaki arayüzelerde bulunan beyin kapillerinin endotelial hücreleri, periferal vasküler sistemde bulunan türlerinden ayırt edilebilen, benzersiz nitelikteki morfolojik, biyokimyasal ve işlevsel özelliklerinden dolayı, KBB'nin anatomik temeli olarak kabul edilmektedir (Engelhardt & Sorokin, 2009; Sa-Pereira, Brites & Brito, 2012). Beyin kapillerinin iç yüzeyinde tek tabaka halinde sıralanan, ince ve düz şekilleri ile birbirine sıkıca bağlı, kan ile doğrudan temas eden bu hücreler, kromatin maddesinin düzensiz dağıldığı pürüzsüz oval çekirdekler, lüminal tarafta kaveol ve benzeri invaginasyonlar, ve sürekli bir bazal membrana; ayrıca, enzim ve transport sistem aktiviteleri için enerji potansiyellerini artıran büyük miktar ve hacimde mitokondriye sahiptir (Sa-Pereira vd., 2012) (Şekil 2.5). Mitokondri ve enerji potansiyelindeki bu artış, besinlerin kandan beyne aktif transportu sırasında gereklidir; serebral fizyolojik fonksiyonlar ve enerji bağımlı transkapiller madde taşınımı ile yakından ilişkilidir (Gültürk, İmir & Tuncer, 2007).

Sirkumventriküler organlarda fenestrasyonlu kılcal damar yatakları haricinde, omurgalı serebral endotelial hücreleri, sıkı bağlantılarla (tight junction, TJ) birbirine bağlanarak KBB'nin fiziksel bariyerini oluşturur; beyin kapillerinin periferal mikrodamarlardan 50-100 kat daha sıkı oldukları belirtilmektedir (Abbott, 2002). İnterendotelial sıkı bağlantılar fiziksel olarak beyinde endotel plazmalemmasını lüminal ve ablüminal membran yüzeylerine bölerek, sekretuar epitele benzeyen kanalların ve transporter moleküllerinin kutuplaşmış halde lokalizasyonuna olanak sağlar (Stokum vd., 2016). Beyin kapillerini oluşturan endotelial hücreler arasındaki bu yoğun sıkı bağlantılar, yüksek bir elektrik direnci oluşturur ve bu direnç diğer dokularda 3-33 Ω/cm^2 iken, KBB'de 1500-2000 Ω/cm^2 dir; bu nedenle parasellüler permeabilite düşüktür (Gültürk vd., 2007).

Beyin mikrovasküler endotelial hücrelerinin periferal dokulardakilerden bir diğer farklılığı, fenestraların bulunmayışıdır. Normal fizyolojik süreçte, beyin damarlanması erken embriyonik dönemde oluşur ve bu dönemde endotel hücreleri vücudun diğer kısımları gibi fenestralara sahiptir. Ancak endotelial dokunun nöral doku ile penetrasyonundan kısa bir süre sonra, fenestrasyon giderek azalmaya başlamaktadır. Bu nedenle endoteldeki KBB özelliklerinin, nöral doku kaynaklı bir sinyal ile başlatıldığına inanılmaktadır (Yılmaz, 2006).

Endotelial hücrelerin sitoplazmasında pinositik vesiküller oldukça azdır; fenestra yapılarının olmaması nedeniyle, KBB'yi geçecek olan bir madde öncelikle kapiller endoteli, internal sitoplazmik alanı, daha sonra ablüminal membranı, perisit veya bazal laminayı aşmak zorundadır. Patolojik durumlarda bazal membran sürekliliği bozulur, vesikül sayısı artar, böylece iyon ve proteinler beyin dokusuna geçer (Gültürk vd., 2007).

Beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin daha sınırlı pinositik vesiküler transport yapılarının yanı sıra işlevsel yönden diğer farklılıkları, taşıyıcı ve transport proteinlerinin ekspresyonunu artırabilmeleri ve gap bağlantıları içermemeleridir (Salameh & Banks, 2014). Bu farklılıklar, sınırlı parasellüler geçirgenlik ve makropinositotik transport ile sonuçlanır. Bu özelliklerinden dolayı proteinleri MSS'nin interstisyel boşluğuna sızdırmazlar (Nag, 2011).

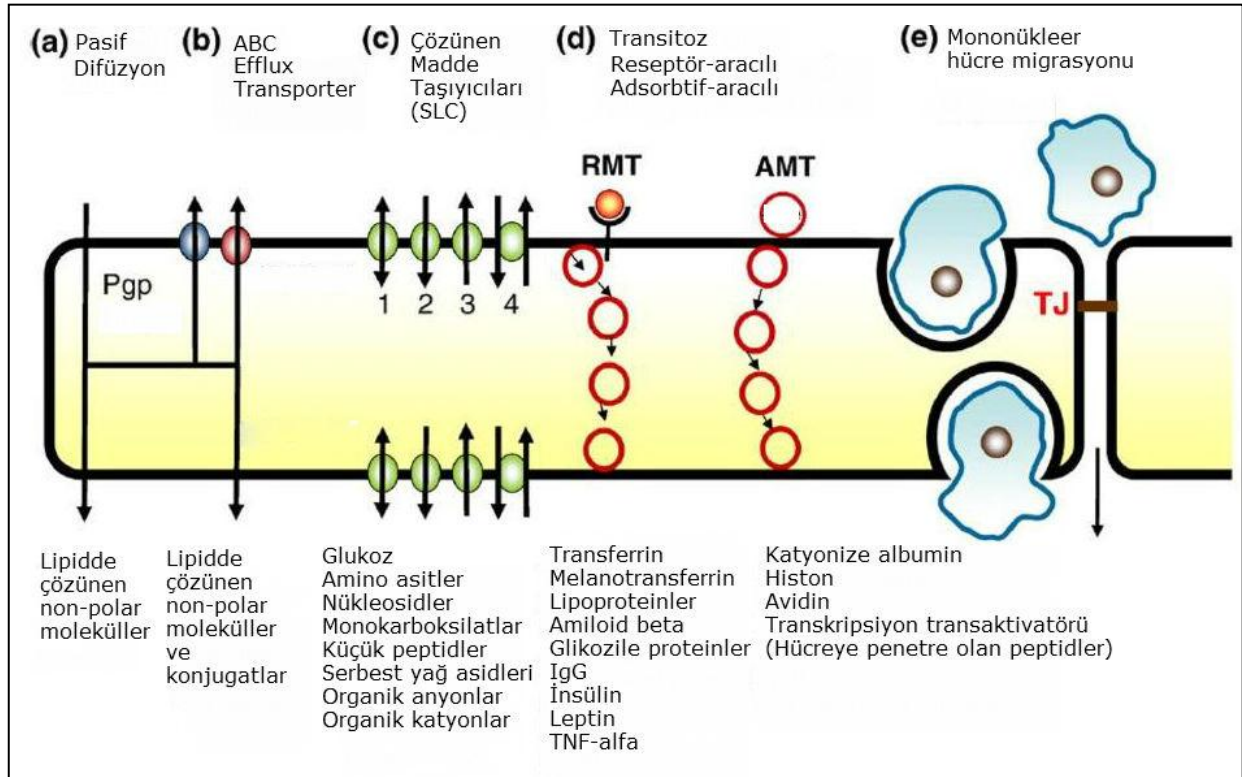
Endotelial hücreler arasındaki boşlukları elimine etmek ve kan yoluyla taşınan maddelerin beyin parenkimal boşluğuna serbest olarak parasellüler difüzyonunu önlemek için, kılcal damarların ve post-kapiller venüllerin endotelial hücreleri, yalnızca primer yalıtım özelliği sağlayan TJ'leri değil, aynı zamanda adherens bağlantılarını (Adherens junction; AJ) da içeren komplekslere sahiptir. Bu bağlantılar, hidrofilik moleküllerin parasellüler akışlarını sınırlar ancak O_2 ve CO_2 gibi küçük lipofilik moleküllerin geçişini sınırlamaz, böylece bu moleküller konsantrasyon gradiyentleri boyunca

plazma membranlarından serbestçe difüze olabilirler. Bunun yanı sıra endotelial hücreler, beyin fonksiyonu için gerekli olan besin maddeleri ve hormonların alınmasını kolaylaştıran özel transport sistemleri ve reseptörleri ile donatılmıştır (Sa-Pereira vd., 2012). KBB'den beyin hücrelerine madde geçişi, bu fiziksel (sıkı bağlantılar) ve metabolik (enzim) bariyerler sayesinde sıkı bir kontrol altındadır (Gültürk vd., 2007).

Endotelial hücreler, birçok molekölü değiştirebilen ve modifiye edebilen çok sayıda enzim ekspresyonu gerçekleştirmektedir, aksi halde bu moleküller KBB'yi doğrudan geçerek nöronal fonksiyonu etkileyebilir (Witt & Sandoval, 2014). Özellikle bazı nörotransmitterler ve ilaçlar, kapiller endotelinin lüminal yüzeyinden sitoplazmaya girdiklerinde, buradaki enzimlerle inaktif formlarına dönüştürölür ve beyne geçişleri engellenir. Dolayısıyla serebral endotelde besin ve ilaçları metabolize edebilen enzimatik bir bariyer vardır. Kan ile taşınan bu tür maddeleri metabolize eden Gama Glutamil Transpeptidaz (GGT), Alkalen Fosfataz ve Aromatik Asit Dekarboksilaz gibi enzimler serebral kapillerde yüksek konsantrasyonlarda mevcut iken, nöronal olmayan dokularda ise daha azdır veya bulunmazlar (Gültürk vd., 2007).

Nörovasküler birimdeki endotelial hücreler, lüminal ve ablüminal membran yüzeylerindeki farklı integral membran proteinleri ile yüksek düzeyde polarizedir (Neuwelt vd., 2011). Transport sistemleri genellikle KBB'nin lüminal yüzeyinde; beyinden kana geçişe olanak sağlayan sistemler ise ablüminal yüzeyinde bulunur (Gültürk vd., 2007). GGT ve alkalen fosfataz enzimleri lüminal tarafta yer alırken, Na^+/K^+ -ATPaz ve sodyum bağımlı nötral aminoasit taşıyıcılar ablüminal yüzeyde bol miktarda bulunur. Ayrıca lüminal membran yüzeyinde, istenmeyen maddelerin dışarı çıkışını sağlayan P-glikoproteinler (PGP) yer almaktadır (Gültürk vd., 2007).

Bazı maddelerin KBB'inden geçişi ve beyne girişleri primer ve sekonder olmak üzere birçok faktöre bağılıdır (Abbott vd., 2010). Primer (KBB'ye ait) faktörler; maddenin moleköl ağırlığı, molekölün konformasyonel olarak değişebilme yeteneği, hücrenin enzimatik sabitliği, hücrenel sekresyon, akışa karşı afinite (PGP), hidrojen bağılayıcı potansiyeller, taşıyıcılara karşı afinite ve mevcut patolojik durumların etkisi olarak sayılabilir. Sekonder veya periferik faktörler ise serebral kan akışı, sistemik enzimatik stabilite, plazma protein bağılayıcıların afinitesi ve mevcut patolojik durumların etkisidir. KBB'den transport şekilleri; basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport, vesiküler transport olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.6). Madde transportunda maddenin lipide çözünürlüğü, difüzyon yeteneği, moleköl ağırlığı, elektrik yükü önemlidir. Dolayısıyla KBB, çeşitli moleköl ve terapötik ilaçların beyin dokusuna geçişinde hız sınırlayan bir faktördür (Gültürk vd., 2007).



Şekil 2.6. Kan-beyin bariyerinden transport yolları. a) Çözünen maddeler hücre membranından pasif difüzyonla endotele geçer. Yüksek lipid çözünürlüğü ve diğer bazı fizikokimyasal faktörler bu sürece yardımcı olur. b) Aktif taşıyıcılar (ABC transporterlar) pasif olarak geçen bazı çözünen maddeleri engeller ve endotelden dışarı pompalar. c) Çözünen madde taşıyıcıları (SLC) yoluyla geçiş pasiftir ya da primer veya sekonder olarak aktiftir; glukoz, amino asit ve nükleosidler gibi polar molekülleri MSS'ye transport edebilir. Bu taşıyıcılar çift yönlü (1), tek yönlü (2,3) veya karşılıklı değişimi sağlayan (4) özellikte olabilir. d) RMT ve AMT vesiküler bazlı sistemlerdir. RMT ligandın reseptörüne bağlanmasını gerektirir; peptid ve proteinler gibi çeşitli makromolekülleri serebral endotelden transport edebilir (transitoz). AMT ise pozitif yüklü makromoleküllerle non-spesifik olarak indüklenir ve endotelden transportunu sağlar. e) Lökositler endotelden diapedez süreciyle veya sıkı bağlantıların tamamen yada kısmen açılması yoluyla KBB'yi aşabilir (Abbott vd., 2010).

2.2.1.2. Bazal membran

Endotelin iç yüzeyi perisitler tarafından çevrelenmiştir; kollajen, laminin, heparin sülfat proteoglikanları, fibronektin, vitronektin, nidojen, perlekan ve agrin gibi birbirine sıkıca bağlanmış ekstraselüler matriks proteinlerinin yan yana üç lamine halinde organize edildiği bir bağ dokusu yapısı olan *Bazal Membran* (Bazal Lamina) üzerine yerleşmiştir (Kurt & Tuncer, 2015). Bazal membran oluşumu ve korunması endotelial hücreler, perisitler ve astrositler tarafından sağlanmaktadır. Bazal membran, küçük moleküllerin difüzyonunda önemli bir bariyer oluşturmaz ancak tutunma işlevi, serebral mikrovasküler sistemin bütünlüğüne ve dolayısıyla doku/hücre organizasyonuna, kararlılığa ve farklılaşmaya katkı sağlayarak, KBB yapısı ve stabilitesi üzerinde önemli rol oynar (Engelhardt & Sorokin, 2009).

Bazal membrana hücrelerin tutunması ve ekstraselüler matriks ile hücre iskeleti arasındaki bağlantı, endotelial hücrelerin matrikse yakın yüzeylerinde bulunan adezyon molekülleri ve matriks adezyon reseptörleri olarak bilinen proteinler tarafından sağlanmaktadır. Serebral iskemi sırasında hücresel adezyon reseptörlerinde ve bunların matriks ligandlarında önemli değişiklikler meydana gelmesi nedeniyle, bu adezyon reseptörlerinin KBB bütünlüğünün korunması için gerekli olduğu ve beyin hasarı sürecinde bu reseptörlerin modülasyonunun bariyerdeki değişikliklerde fonksiyonel olarak önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Sa-Pereira vd., 2012).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), bazal membranı parçalama özelliğine sahip olan enzimlerdir; beyin endotelial hücrelerinin çapalanmasını azaltır ve TJ bütünlüğünü etkileyerek KBB'nin yapısında değişikliğe yol açarlar. MMP-2 ve MMP-9 tip IV kollajen, elastin, fibronektin ve agrekan gibi bazı bazal membran bileşiklerini proteolize edebilen iki jelatinazdır. Serin proteazlar, sistein proteazlar ve heparanaz, bazal membranı etkileyebilen diğer proteaz aileleridir (Sa-Pereira vd., 2012). Aktive olan proteazlar ayrıca, sitokin ekspresyonunu tetikleme özelliklerinden dolayı inflamatuvar mediyatörler olarak önemli rol oynamaktadır.

Kılcallardan daha büyük damarlardaki endotelial bazal membran, perivasküler *Virchow Robin Boşluğu* tarafından dış taraftan sınırlandırılmıştır (Şekil). Virchow Robin boşluğu, subaraknoid boşluğun BOS ile dolu bir uzantısıdır. Bu uzantı, içeriden endotel bazal membranı ile dışarıdan ise glial, ikinci bir bazal membranla sınırlandırılmıştır. Virchow Robin boşluğu, beyin parenkimi içerisine giren penetran arteriyollerini izler, kapiller yatağa yakın fenestre olur ve astrosit uç-ayaklarının doğrudan damar duvarıyla temas ettiği yerde beyin kapilleri seviyesinde gözden kaybolur (Stokum vd., 2016). BOS pulsasyonu veya vasküler genişlemenin neden olduğu mekanik travma, damar duvarı geçirgenliğindeki bozukluklardan dolayı sıvı sızıntısı ve perivasküler dokuda iskemik hasar oluşumu gibi nedenlerle Virchow Robin boşluğunda dilatasyon meydana gelebileceği ve anormal düzeydeki dilatasyonun yaşlanma, demans, hipertansiyon gibi vasküler risk faktörleriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir; bu dilatasyonun serebral mikrovasküler hastalıkların duyarlı bir göstergesi ve biyobelirteci olabileceği ileri sürülmektedir (Patankar vd., 2005).

Bazal membran, stres uyarılarına yanıt olarak ve bazı patolojik durumlarda kalınlaşabilir veya daha da ince olabilir. Bazal membranın karakteristik özelliklerinin kaybedilmesi, KBB yapısının bozulmasına neden olan faktörlerden biri olarak görülmektedir (Sa-Pereira vd., 2012).

2.2.1.3. Nöronlar

Nöronlar çekirdek, organeller, akson ve çok sayıda dendritler içeren bir hücre gövdesi ile karakterizedir. İnsan beynindeki neredeyse her nöronun kendi kapillerine sahip olduğu tahmin edilmektedir; bu durum sağlıklı bir beyin fonksiyonu için yakın bir nöronal-vasküler ilişkinin önemini ortaya koymaktadır (Sa-Pereira vd., 2012). Nöronların enerji ve oksijen ihtiyaçları doğrultusunda kan temininin mekansal ve zamansal olarak ayarlanmasında, nörovasküler birimdeki nöronlar, astrositler ve serebral damarlar arasında kompleks iletişim mekanizmaları bulunmaktadır. Bu nedenle, normal koşullarda bölgesel ve lokal akışın kontrolü ve modülasyonu, nörovasküler kenetlenmeye bağlıdır. İskemide nöron hasarı ve mikrodamar yanıtın temporal ve topografik eşzamanlılığı nedeniyle, nöron-mikrodamar etkileşimlerinin iki yönlü olabileceği düşünülmektedir (Sa-Pereira vd., 2012).

2.2.1.4. Astrositler

Astrositler MSS'de önemli görevleri olan, özelleşmiş glial hücreler olup, uç-ayakları KBB endotelinin dış yüzeyi üzerinde bazal membranın üzerine kaplar; hücre iskeletinin ara filamentini ve glial fibriler asidik proteini (GFAP) içeren çok sayıda çıkıntı ile karakterizedirler. Soma'dan tüm yönlerde radyal ve simetrik olarak uzanan 40 büyük GFAP-pozitif çıkıntı varlığı ve beş farklı kan damarının bir kortikal insan protoplazmik astrositi tarafından kapsandığı belirtilmiştir. Bu hücreler, endotelin % 99'undan fazlasını kaplamakta ve KBB yapısına, gelişimine ve özgün endotelial fenotipine katkıda bulunmaktadır. Bu rollerinin, çözünebilir faktörlerin ekspresyonu ve salınımı aracılığıyla ve endotelial hücrelere anatomik olarak yakın olmaları nedeniyle mümkün olduğu düşünülmektedir (Sa-Pereira vd., 2012).

Endotelial hücrelerle etkileşen astrositler, TJ'leri güçlendirir ve gap bağlantı alanını azaltır, bu yönüyle KBB'nin sınırlı permeabilitesi ve bütünlüğünde önemli bir role sahiptir. Bazı çalışmalarda astrosit varlığının, transendotelial elektrik direncini artırdığı ve KBB endotelinin geçirgenliğini azalttığı belirtilmiştir (Minami'den aktaran Sa-Pereira vd., 2012). Astrositler ile endotelial hücreler arasındaki etkileşimler, fizyolojik ve patolojik durumlarda beyinde su ve elektrolit metabolizmasının düzenlenmesinde önemli görülmektedir.

Serebral damarların parenkimal yüzeyi, yaklaşık 20 µm açıklıklarla (gap) ayrılmış astrosit uç-ayaklarının bir mozayiki ile tamamen kaplıdır (Stokum vd., 2016). Astrositler, KBB matürasyonu ve korunumu için büyüme faktörleri üretir ve lokal su transportunu düzenler. Bunun yanı sıra, var olan çok sayıda çıkıntılarının, kemirgen korteksi ve hipokampüste 300-600 nöronal dendrit ve 10^5 sinaps ihtiva ettiği düşünülen tek bir astrositik domen

oluşturduğu düşünülmektedir (Sa-Pereira vd., 2012). İnsan korteksinde ise, aktiviteyi tek bir astrosit algılayabilir ve domeninde bir milyondan fazla sinaps fonksiyonunu düzenleyebilir. Bu nedenle, astrositlerin nörovasküler birim içerisindeki dinamik sinyalizasyon için merkezi öneme sahip oldukları ve nörovasküler kenetlenmenin koordinasyonunda önemli rol oynadıkları kabul edilmektedir (Koehler, Roman & Harder, 2009).

Astrositler, lokal nöronal aktivitenin anlık değişimlerine yanıt olarak serebral kan akışını düzenlemek için, vasküler düz kas hücrelerini uyarabilmelerinin yanı sıra, sinaps oluşumu ve esnekliği, enerjetik ve redoks metabolizması, iyonların ve glutamat gibi nörotransmitterlerin sinaptik homeostazı gibi, nöronların çeşitli işlevlerine katkıda bulunurlar (Salmina, 2009). Elde edilen veriler, nöron-glia etkileşimindeki değişimlerin nörodejeneratif hastalıkların gelişimiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

MSS'nin mikrovasküler yapısının; nöronal aktiviteye bağlı olarak iyon ve diğer maddelerin MSS mikroçevresine geçişinin kontrolü ve de nöronal aktivitenin ihtiyacına göre hızla bölgesel kan akımının regülasyonu şeklinde iki önemli görevi bulunmaktadır. Bu iki görev de Glia limitans adı verilen özel bir yapının yardımıyla, astrosit sinyalleri aracılığıyla kontrol edilmektedir. Glia limitans astrosit uzantılarından oluşmuş olup, beyin ve spinal kordun tüm yüzeyini kaplamaktadır. Dış yüzeyde subaraknoid aralığa doğru uzanan kısmı "glia limitans superficialis"; iç yüzeyde damarların etrafında olan kısmı ise "glia limitans perivascularis" olarak adlandırılmaktadır (Kurt & Tuncer, 2015).

Astrositler nitrik oksit, prostaglandin, araşidonik asit gibi mediyatörler salgılar, böylece bölgesel kan akımını yakın temas halinde olduğu kan damarlarına etki ederek düzenler. Ayrıca kan damarlarını çevreleyen astrosit uç-ayakları Akuaporin-4 adı verilen, MSS'nin su homeostazını düzenleyen su kanallarının ekspresyonunu gerçekleştirmektedir. Ranvier boğumlarını ve sinapsları uzantıları ile saran astrositler, bölgeye özgü kan akımının nöronal aktiviteye göre düzenlenmesi amacıyla, arteriyel kontraksiyon ve dilatasyonu kontrol eder; sinapsın ihtiyacı olan iyon ve nörotransmitter homeostazını sağlar (Kurt & Tuncer, 2015).

2.2.1.5. Mikroglialar

Mikroglialar, beyindeki immün yeteneğe sahip hücreleri oluşturan glial hücrelerin bir sınıfıdır; çeşitli hasar ve hastalıklar ile önemli düzeyde ilişkilidirler. MSS'nin diğer hücrelerinin aksine, mikrogliaların ontogenetik olarak mononükleer fagosit kökenli hücrelerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Monositler, embriyonik gelişim sırasında beyin içine girer ve makrofajların yüzey antijenlerini sergileyen beyin yerleşimli mikroglialara farklılaşırlar (Kim & de Vellis, 2005).

Mikroglia, beyin koşullarına uygun olarak iki temel form ile karakterizedir. Fizyolojik durumda, dinlenme halindeki mikroglialar, MSS'de homeostatik bozukluğu hemen tanıyabilen bir model oluşturan, dallanmış morfoloji olarak da bilinen uzun ince çıkıntılara sahiptir. Patolojik bir durum sırasında mikroglia aktive olur; kısa çıkıntıları olan amoeboid morfoloji ile karakterize edilen fagositik bir morfolojiye bürünebilir. Bir formdan diğerine dönüşüm oksijen radikalleri, proteazlar ve proinflamatuvar sitokinler gibi sitotoksik potansiyeli olan maddelerin salınımında ve yüzey antijenlerinde değişikliklerle bağlantılıdır (Kim & de Vellis, 2005). Hasara karşı mikroglial reaktivite komplikedir, çünkü bu hücreler zamanla hatta eşzamanlı olarak farklı fenotipler gösterebilir. Fagositik bir fenotip, genellikle beyin parenkiminden nörotoksik maddeleri elimine etme mekanizmasıdır (Sa-Pereira vd., 2012). Bunun yanı sıra, mikroglialar perivasküler boşlukta lokalize olduğundan, endotelial hücrelerle olan etkileşimleri nedeniyle KBB yapısını etkileyebilmektedirler. Aktive formlarından salınan yüksek düzeyde TNF- α 'nın, KBB disfonksiyonuna yol açtığına dair çalışmalar mevcuttur (Nishioku vd., 2010).

2.2.1.6. Oligodendrositler

Oligodendrositler, MSS'de miyelin tabakalarının oluşumundan sorumlu glial hücrelerdir. Küçük bir hücresel gövde ve farklı nöronların aksonlarını saran bazı çıkıntılar ile karakterizedirler. Oligodendrositler, lipidleri ve miyelin spesifik proteinleri içeren ve MSS'deki aksonların etrafına sarılan çok sayıda miyelin membran bileşenleri sentezler; sonuçta sitozolik ve dış yüzeylerine sıkıca tutturulmuş çok tabakalı bir zar yığını meydana getirerek aksonu izole eder, bilginin hızlı bir şekilde işlenmesine zemin hazırlayan hızlı bir aksiyon potansiyeli iletimi sağlar (Sa-Pereira vd., 2012).

Miyelinlenecek olan nöronların gelişimsel programına uygun olarak, oligodendrosit öncül hücreler (OPC'ler) terminal farklılaşmaya girerler ve miyelin-oluşturan oligodendrositler haline dönüşürler. Ancak bazı patolojik koşullarda, OPC'lerin olgun oligodendrositlere farklılaşmasında yetersizlik, oligodendrositlerin yoğun bir yıkımı ve kaybı olabilir. Bu koşullarda, aksonlarda miyelin kılıfı oluşumu tamamlanamaz ve bunlar stres oluşturan çevresel faktörlere karşı daha hassas ve savunmasız hale gelir (Sa-Pereira vd., 2012). Bunun yanı sıra, saltatorik iletim devre dışı kalır ve nöronal fonksiyon kayıplarına yol açar. Bu tür nörodejeneratif durumların, KBB bütünlüğünün bozukluğu ile karakterize olabileceği belirtilmekte ve bu önemli etkileri nedeniyle, miyelinasyon ile ilişkili bu hücrelerin, nörovasküler birimdeki hücre tipleri kapsamına dahil edilmesi gerektiği ileri sürülmektedir (Sa-Pereira vd., 2012).

2.2.1.7. Perisitler

Beyin perisitleri normalde yıldız şeklinde polimorfik hücrelerdir; küresel veya oval bir hücre gövdesi ve belirgin bir yuvarlak çekirdeğe sahiptirler. Perisitlerin, kan damarının ekseni boyunca konumlanan uzun sitoplazmik çıkıntıları bulunur ve daha küçük çembersel kollarla vasküler duvarı kuşatan sekonder ve tersiyer çıkıntılar verir. Kapiller uzunluğunun 100 um'si başına 300-800 nm genişliğinde 90'a kadar çıkıntısı olabilir. Çıkıntıların morfolojisi heterojen olma eğilimindedir ve perisitlerin fonksiyonel farklılaşmalarını ortaya koyar. Perisitler, endoteliyal hücrelerin aksine büyük vakuoller ve lizozomlar içerir; nükleer ve sitoplazmik matrikslerinde elektron yoğunluğu daha fazladır. Sitoplazmik lizozomların genişliği granüllülük görünümü verir; özellikle insan beynindeki perisitler yüksek bir asit fosfataz içeriğine sahiptir (Sa-Pereira vd., 2012).

Perisitlerde kontraktil ve sitoskeleton proteinleri bulunmaktadır; ayrıca tanımlanmalarını sağlayan yüzey antijenlerinin ekspresyonunu gerçekleştirirler. Bunların arasında, MSS perisitlerinde mikrofilament demetlerinde lokalize olan baskın kontraktil protein α -düz kas aktini (α -SMA)'dir. Son yıllarda, başta hücre kültürü olmak üzere çeşitli çalışmalar ile perisitlerin kontraktil, immün, fagositik, göç etme ve anjiyogenik işlevleri belirlenmiştir. Ayrıca fibroblast, adiposit, kondrosit, düz kas, endotel ve makrofaj/dendritik hücelere farklılaşabildikleri bildirilmiştir (Sa-Pereira vd., 2012).

Serebral kan akımının düzenlenmesine katkıda bulunan ve KBB'nin sızdırmazlığını güçlendiren perisitler, damar boyunca değişen aralıklarla endotel bazal membranında gömülüdür (Stokum vd., 2016). Endoteliyal hücreler ile aralarındaki yaklaşık 20 nm kadar olan kısa mesafe, MSS içindeki yüksek yoğunlukları, gap bağlantıları aracılığıyla yakın ilişkileri, vida-ve-yuva ilişkisi (peg-and-socket) ve endoteliyal hücreler ile adezyon plak bağlantıları, perisitleri KBB'nin korunumu ile stabilizasyonunda ve TJ'lerin gelişiminde önemli kılarak, düşük parasellüler permeabiliteye katkı sağlamaktadır. Gap bağlantıları, iyonların ve küçük moleküllerin değişimi yoluyla iletişime olanak sağlar; adezyon plakları, perisitlerden diğer hücelere kontraktil kuvvetlerin iletilmesini destekler; vida-ve-yuva temas noktaları ise perisitlerin bazal membrandan penetre olmalarını, diğer hücelere ve damarlarla temas etmelerini engeller (Sa-Pereira vd., 2012).

Perisitler, kapiller kan akışını engelleyen bir süreç olan iskemi sırasında, kapiller çapı modüle edebilmektedir. Dolayısıyla, perisitler beyin vasküler sisteminin korunmasında ve beyin homeostazında önemli fonksiyonlara sahiptir. Perisitlerin kapladığı alandaki % 20'lik bir kaybın vasküler hasarı başlatabileceği; bu alandaki iki kat yani % 40'lık bir kaybın ise ciddi bir

nörovasküler yetmezliğe, nöronal yapıda değişikliklere ve davranış bozukluklarına neden olabileceği belirtilmiştir (Sa-Pereira vd., 2012).

Yapılan bir araştırmada, iskeminin fare beyin mikrodamarlarında yer alan perisitlerin kasılmalarını indüklediği bildirilmiştir (Yemisci vd., 2009). Bu çalışmada, 2 saat boyunca sürdürülen orta serebral arter oklüzyonu sırasında perisitlerin kasıldıkları ve hatta oklüzif arter yeniden açıldıktan sonra dahi kasılmalarını sürdürdükleri gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, perisitlerin kılcal damarların segmental olarak daralmalarına, kılcal konstriksiyonlarda sıkışan eritrositlerin yönlerini değiştirmelerine ve mikrosirkülasyonun engellenmesine neden olduğu; bu anormalitenin peroksinitrit tarafından da taklit edildiği, peroksinitrit oluşumunun, oksidatif ve nitrosatif stresin baskılanması ile bu durumun tersine döndürebileceği ileri sürülmüştür. Elde edilen bu veriler, akut strese yanıtta kapiller kan akışının fokal regülasyonunda perisitlerin rolleriyle ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır.

Mikrovasküler yapıdaki subendotelial lokasyonlarından dolayı perisitlerin, serebrovasküler lezyon oluşumu sonrasında meydana gelen koagülasyon olaylarının düzenlenmesinde işlevleri olabileceği ileri sürülmektedir (Bouchard, Shatos & Tracy, 1997).

Perisitlerin, in vitro beyin endotelial hücre fibrinolizini negatif yönde regüle ettiği, böylece prokoagülan aktiviteyi desteklediği; bunun yanı sıra, antitrombin etkileri olduğu bilinen serpin proteaz neksin-1'in başlıca in vitro kaynağı oldukları ve bu özelliklerinden dolayı endojen antikoagülan aktivite gösterebilecekleri ileri sürülmektedir (Kim vd., 2006). Bu bilgiler ışığında, perisitlerin pro-ve anti-koagülan etkilere sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, KBB oldukça fragil olan beyin hücrelerinin fizyolojik koşullarda bütünlüğünü ve homeostazını sağlayarak, hem yapısal hem de metabolik bariyerler ile beynin kandaki değişimlerden korunması, selektif transport, kan ve beyindeki maddelerin metabolize edilmesi ve modifikasyonu ile nöronlara optimum bir ortam sağlamaktadır (Gültürk vd., 2007). KBB permeabilitesinin artması, hücre hasarı, nöronal inflamasyon ve beyin ödemi gelişimine neden olması bakımından klinik açıdan önem teşkil etmektedir.

2.3. Serebral İskemi

2.3.1. İskemi ve İnme

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akımının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu dokunun oksijen ve besinden yoksun kalması şeklinde ifade edilmektedir. İskemi sürecinde hasar gören bölgede damar yatağının otoregülasyonunun bozulması önemli bir sorundur. Etkilenen alanın tekrar kanlanması durumu olarak belirtilen *Reperfüzyon* sırasında, serebral damar yatağının hidrostatik basıncı artmaktadır ve bu durum KBB'nin ani bir şekilde açılmasına neden olmaktadır (Kumral, 2001). Ödem ve beyin hasarına neden olan zincirleme olayların meydana geldiği *Reperfüzyon Hasarı* denilen bu süreçte, beyin dokusunda, hasar mekanizmalarının devam ettiği, iskemiye göre çok daha ciddi hasarların olduğu belirtilmektedir.

Fokal ve *Global* olmak üzere iki tip serebral iskemi tanımlanmaktadır. Fokal İskemi, beynin belirli bir bölgesindeki; Global iskemi ise beynin tamamı ya da önbeyin bölgesindeki kan akışının azalmasıdır (Bacigaluppi & Hermann, 2010). Fokal serebral iskemide özellikle *İskemik Çekirdek* (Ischemic Core) ve *Penumbra* olarak adlandırılan iki alan gözlenmektedir. Bu iki alan esasen beyne özgü anatomik alanlar değildir. İskemik çekirdek iskemiden ciddi düzeyde etkilenen, nekrotik nöronların fazlaca bulunduğu, kan dolaşımının yeterli düzeyde sağlanamadığı, geri döndürülmesi olanaklı görülmeyen bir alan iken; penumbra iskemik çekirdeğin distalinde yer alan ve kollateral dolaşım tarafından beslenebildiği için infarktüs sonrası saatlerce canlılığını koruyabilen, klinikte terapötik açıdan hücrel ve moleküler bir hedef olarak değerli görülen, umut vadeden bir alandır (Harukuni & Bhardwaj, 2006). İskemik alan içinde bulunan bir diğer alan *Benign Oligemi'dir*. Penumbranın periferinde yer alan bu alanda serebral kan akışı normalin altındadır; doku perfüzyonundaki ani kan basıncı düşüklüğü gibi hemodinamik yetersizlik durumlarında infarkt tehlikesi söz konusudur (Kutluk, 2004).

Serebral iskeminin patofizyolojisi ve tedavisinin sistematik olarak incelenmesinde kontrollü, tekrarlanabilir ve kraniektomi gerektiren ya da gerektirmeyen, çeşitli serebral iskemi hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller *İskemik İnme Modelleri* olarak da tanımlanmaktadır (Traystman, 2003; Durukan & Tatlisumak, 2007). İnsanlarda iskemik inmenin nedenlerinin, anatomik yerleşimlerinin ve klinik tablosunun çeşitlilik göstermesi; histopatolojik, biyokimyasal ve fizyolojik açıdan detaylı incelemelerin yapılabilmesi için invaziv cerrahi işlemlerin gerekebilmesi; iskemik hasarın ilk saniyelerinden itibaren gerçekleşen olayların kontrollü olarak yalnızca laboratuvar ortamında incelenebilmesinin mümkün olması gibi nedenlerden dolayı, hayvan modellerinden yararlanılması değerli ve gerekli görülmektedir (Ginsberg & Busto, 1989).

Bu hayvan modelleri geçici ve/veya kalıcı fokal ve global olmak üzere başlıca iki grupta incelenmektedir. Fokal modeller arasında proksimal ya da distal orta serebral arterin oklüzyonu; tromboembolik model; endotelin modeli; fototromboz modeli ve serebral venöz tromboz modeli gibi örnekler yer almaktadır. Global modellerde ise özellikle ana karotis ve/veya vertebral arterlerin oklüzyonları yapılmaktadır. Ancak iskemik inme kliniği ile hayvan modelleri arasında, tedavide kullanılan ajanların insanlarda beklenen etkiyi göstermemesinin önemli nedeni olan çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Hayvan iskemik modellerinde, fizyolojik değişkenlerin ve tedavinin kontrollü olarak izlenebildiği homojen koşullar oluşturularak, risk faktörleri bulunmayan, genç ve genetik yapıları uniform olan hayvanlarla çalışılmaktadır. Erken dönemde histolojik analizler yapılabilmesi mümkündür. İnsanlarda ise inme heterojen yapıda olup, risk faktörleri ve eşlik eden başka patolojileri bulunan, özellikle yaşlı hastalarda görülmektedir. Bununla birlikte, hastalarda iskemik hasarın büyüklüğü ve dağılımları farklılık gösterebilmektedir. Acil servise başvuru zamanı büyük önem taşımaktadır. Tedavinin etkileri ancak geç dönemde değerlendirilebilir ve klinik skalalardan daha direkt bir yöntem genellikle kullanılamamaktadır (Kutluk, 2004).

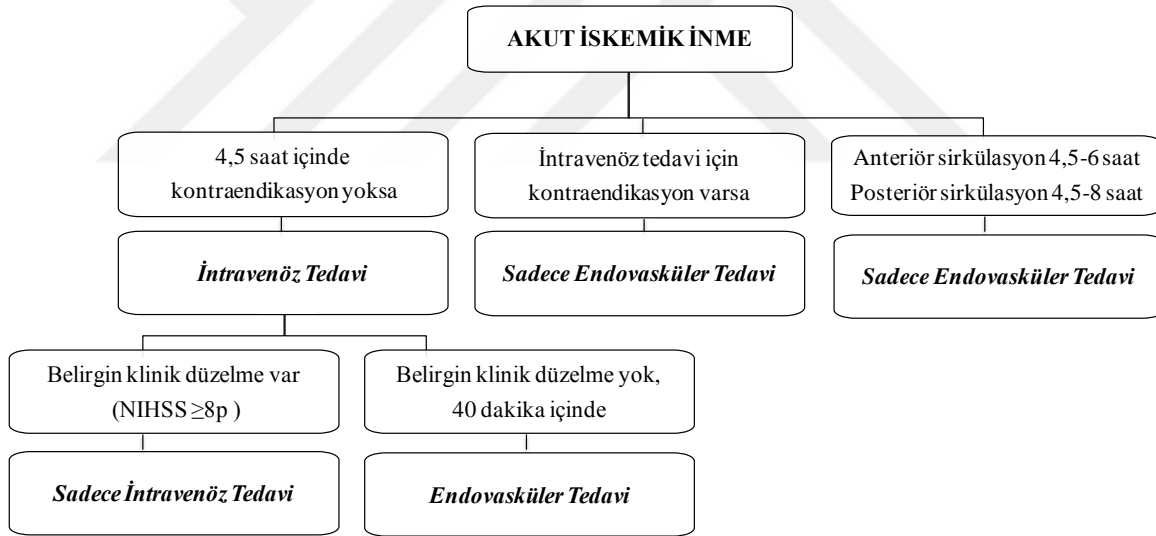
Vasküler sistem ile ilişkili patolojik süreçlerin neden olduğu Serebrovasküler Hastalıklar geniş bir beyin hastalıkları grubudur. Özellikle gelişmiş ülkelerde major ölüm nedenlerinden biridir; nörolojik morbiditenin en sık nedenidir. Üç ana patojenik mekanizma söz konusudur: (1) Trombotik tıkanma, (2) embolik tıkanma ve (3) damar yırtılmasıdır. "İnme" (strok), belirtiler akut olarak ortaya çıktığında, bu durumların tümü için kullanılan klinik bir tanımlamadır (Tuzlalı, Güllüoğlu, Çevikbaş, 2014, syf 814).

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre *İnme*; vasküler neden dışında görünürde başka bir neden olmaksızın, aniden yerleşip, fokal (veya global) serebral fonksiyon kaybına yol açan, 24 saat veya daha uzun sürebildiği gibi ölümle de sonuçlanabilen klinik bir durumdur. Ancak bu inme tanımının kullanımına, Uluslararası güncel klavuzlarda son verilmiştir. Modern beyin görüntüleme teknikleri kullanımıyla elde edilen verilere dayanılarak, serebral infarktüs için 24 saate dahil edilme kriterinin doğruyu yansıtmadığı belirtilmektedir, çünkü kalıcı hasar çok daha erken gerçekleşebilmektedir (Sacco vd., 2013). Ayrıca MSS iskemisi olan hastaların tedavisinin ise, yalnızca infarkt gelişip gelişmediğine göre değil, doğrudan nedene yönlendirilmesi gerektiği; infarktüsün lokasyonu ve büyüklüğünün, uygulanacak tedavinin seçiminde dikkate alınacak bir değişken olduğu ileri sürülmektedir (Sacco vd., 2013).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından inme ile ilişkili 2012 yılına ait ölümlerin 6,7 milyon olduğu açıklanmıştır (World Health Organization, 2014). Ölüm nedenleri arasında kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü sırada yer

almakta; inme sonrasında hastaların %15-30'u kalıcı sekel ile ve yaklaşık % 20'si ise bakıma muhtaç halde yaşamını sürdürmek durumunda kalmaktadır (Rosamond vd., 2007). Bu durumun neden olduğu önemli ölçüdeki ekonomik yüke rağmen günümüzde akut iskemik inme karşı etkinliği kanıtlanmış olan uygulama, erken tromboliz (doku plazminojen aktivatörü; tPA) işlemidir. Uygulanan güncel tedavilerin çoğu son felcin komplikasyonlarını azaltmak veya tekrarını engellemek amacıyla tasarlanmıştır. Bununla birlikte bu alanda yapılan çok sayıda araştırma çalışmalarından başarı sağlanamamıştır.

Klinikte serebrovasküler olay sonucu acil servise başvuran ve kontrastsız beyin tomografi görüntülemeye hemoraji gözlenmeyen hastalar *Akut İskemik İnme* tanısı almaktadır ve bu hastalara tıkalı damarı açma (rekanalizasyon) işlemleri uygulanmaktadır. Hastaların durumları ve kontraendikasyonları doğrultusunda uygun görülen işlemler intravenöz tromboliz (rtPA), endovasküler tedavi ya da her ikisi şeklinde olmaktadır (Şekil 2.7). Bu işlemler sonrasında gerekli görüldüğü hallerde hastalara intravenöz Mannitol ve sodyum takviyesi yapılmaktadır.



Şekil 2.7. Klinikte akut iskemik inme tanısına uygulanan protokol.

Akut iskemik inmede, yeterli düzeyde kanlanma sağlanamadığı için besin ve oksijenden yoksun kalan serebral ve sistemik dokularda oluşan hasarın şiddeti ve ödem oluşma riski, rekanalizasyonla birlikte reperfüzyon sürecinde daha da artmaktadır; bu durum kötü prognoz ile sonuçlanabilmektedir. Bunun dışında, hastalara, oluşan hasara ve nöroinflamasyona karşı, rekanalizasyon işlemi öncesinde ya da sırasında uygulanan, Beyin Krizi Protokolü ve Ulusal ve Uluslararası (Türk Beyin Damar Hastalığı Derneği ve American Heart Association) Klavuzlar dahilinde etkinliği kanıtlanmış hali hazırda herhangi bir ilaç tedavisi ve medikal infüzyon uygulanmamaktadır.

Akut İskemik inmede, olayın hangi arteriyel alanda geliştiğinin saptanması oldukça önemlidir; bununla ilgili çeşitli inme topografilerinin olduğu belirtilmektedir (Kumral, 2001). Karotis alanı infarktları bunlardan biridir. Her iki karotiste gelişen aterosklerotik lezyonlar veya diseksiyonlardan sonra, akut olarak ipsilateral hemisferde infarktlar meydana gelmektedir. Karotisin tam tıkanmasında, aynı hemisferde % 80 oranında infarkt olduğu belirtilmektedir. Burada en önemli etken, pial-pial (Orta serebral arter- Anteriör serebral arter arası, Orta serebral arter- Posterior serebral arter arası) ve Willis kollateral dolaşımının mevcut olup olmamasıdır. Tıkanma veya embolizasyon sonucu, geçiciden kalıcıya kadar değişen nörolojik bozukluklar ortaya çıktığı vurgulanmaktadır (Kumral, 2001).

2.3.2. Serebral İskemi Patofizyolojisi

Beyin dokusu bazı koruyucu mekanizmalara sahiptir. Bunlardan biri, MSS içerisine hücre ve makromoleküllerin hareketinin engellenmesi ya da kısıtlandırılmasıdır. Bir diğeri, beyni koruma ve destekleme görevi olan endotelial hücreler, mikroglialar, astrositler ve oligodendrositler gibi kendi immun-düzenleyici hücrelere sahip olmasıdır (Gendelman, 2002). Vücutta her dokunun hasara yanıtı ve hasara karşı korunma yeteneği birbirinden farklı olmakla birlikte, dokusunu oluşturan hücrelerin membran lipidlerince zengin oluşu, nöronların membran/sitoplazma oranlarının diğer hücrelere göre daha büyük oluşu, oksidatif metabolik aktivitenin yüksek ancak antioksidan enzim aktivitelerinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı, beyin dokusu iskemi ve oksidatif hasara karşı oldukça hassastır ve korunma ihtiyacı diğer dokulardan daha fazladır. Nöronlar, iskemik koşullara karşı en duyarlı hücrelerdir ve bu süreçte yapısal değişikliklere uğrarlar. Örneğin, hipokampus nöronlarında golgi ve endoplazmik retikulum sayılarında azalmalar, poliribozomlarda ayrılmalar, mitokondrielerde geçici şişkinlikler, ani ve yoğun hücre ölümleri meydana gelmektedir.

Beyin dokusunda, serebral kan akışının kritik eşik değerin altına düşmesi sonucu oluşan iskemi ve bunu takiben reperfüzyon sırasındaki hasar sürecinde mitokondri disfonksiyonu ve ATP üretiminin yetersizliği, sitozolik ve mitokondriyel Ca^{+2} artışı ve bununla birlikte hücrede çeşitli enzimlerin aşırı düzeyde aktivasyonu, oksidatif ve nitrosatif stres, endotel disfonksiyonu, bozulan KBB permeabilitesi gibi nedenlerle, MSS'ye immun hücrelerin transendotelial göçü, aşırı immun-yanıt gibi olaylar, dokuda yapısal ve geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Şener & Yeğen, 2009; Göbel vd., 2011; Durukan & Tatlısumak, 2007) (Tablo 2.2). Serebral iskemide gerçekleşen bu patofizyolojik olaylardan hiçbiri, kendi sırası gelince oraya çıkıp çizgisel bir progresyon göstererek sona ermez. Mekanizmalar ardı sıra ya da aynı anda gelişerek karmaşık interaksiyonlar göstermektedir. Bunlardan bazıları iskemik dokuyu korurken, bazıları oluşan hasarı daha da

ağırlaştırmaktadır. Aynı olay bile, erken ya da geç dönemde ortaya çıkışına göre, iskemik nöronlar üzerine zıt etki gösterebilmektedir (Kutluk, 2004).

İskeminin ilk dakikaları içerisinde hızla ve önce glial hücrelerden başlamak üzere, hücre içi enerji mekanizmaları bozulur. Na^+/K^+ -ATPaz ve iyon pompalarının işlevlerinde aksamalar meydana gelir (Durukan & Tatlısumak, 2007) (şekil 2.9). N-metil-D-aspartat (NMDA) tipi glutamat reseptörlerinin etkilenmesi ile hızla eksitatör amino asitler salınır ve ekstraselüler Ca^{+2} hücre içine girer. NMDA reseptörleri nöronlar ve özellikle endotelial Nitrik Oksit Sentaz aktivitesini uyararak nitrik oksit (NO) salınımını artırır. Ayrıca serbest radikaller, serbest yağ asitleri, sitokinler, peroksinitrit ve laktat düzeylerinde artış görülür. Glial hücreler bu maddeleri ekstraselüler boşluktan temizlemeye çalışırken kendileri şişmeye başlar. Bu erken oluşum sitotoksik ödemdir. Artan NO ve benzeri moleküllerin etkisi sonucu, endotel hücreleri arasında bağlantılar üzülür ve plazma ekstraselüler aralığa sızar; daha sonra gelişen bu durum vazojenik ödemdir. İskemik beyin ödemi hasarlı bölgede özellikle penumbra alanında mikrodolaşımda kompresyona yol açar; perifokal bölgede doku basıncı artar ve kan dolaşımı azalır (Kumral, 2001). Endotelial şişe, kan damarının i çapının daralmasına yol açarak, iskemi başlangıcında dakikalar ve saatler içerisinde ciddi bir enerji yetersizliğine neden olabilir (Gültürk vd., 2007). Ödem ileri derecede olduğunda intrakraniyal basınc (İKB) yükselir. Çok ileri düzeylerdeki ödem, herniasyon ve beyin sapı kanamalarına yol açarak mortaliteyi etkiler (Kumral, 2001; Kempinski & Volk, 1994).

Tablo 2.2. MSS İskemik Hasarına Katılan Süreçler (del Zoppo, 2010).

| Metabolik Olaylar |
|---|
| Serbest Radikallerin Oluşumu (NO Oluşumu; Protein Oksidasyonu; Lipid Peroksidasyonu) |
| Nöronların Gelişen Enfarktüs ve Peri-İnfarkt Alandaki Depolarizasyonu (Laktik asidoz; Ca ⁺² aracılı hücre ölümü; Ca ⁺² atılım mekanizma yetmezliği; Sitozolik Ca ⁺² artışı) |
| Lipolitik Yolakların Aktivasyonu |
| Protein Fosforilasyonundaki Değişimler |
| Glukoz Metabolizmasının Baskılanması ile ATP Depolarının Tükenmesi |
| Mitokondriyal Disfonksiyon |
| Proteoliz |
| Protein Sentezi |
| Hüresel Olaylar (Akut) |
| Hücre Sinyal Yolaklarının Aktivasyonu |
| Endotelial Hücre Matriks-Adezyon Reseptör Ekspresyonunda Azalma |
| Astrofit Matriks-Adezyon Reseptör Ekspresyonunda Azalma |
| Astrofitik Uç-Ayakların Vasküler Bazal Lamina Matriksinden Ayrılması |
| Vasküler Bazal Lamina Matriks Bileşenlerinin Degredasyonu |
| Matriks Proteaz Ekspresyonu (Matriksmetalloproteinaz; Katepsin; Heparanaz; Serin proteazlar) |
| Mikrovasküler Permeabilite Artışı |
| Astrofitik Şişme |
| Nöronal Şişme |
| Nöronlardan Glutamat Salınımı |
| Nöronların Gelişen Enfarktüs ve Peri-İnfarkt Alanındaki Depolarizasyonu |
| Sitokinlerin Ekspresyonları |
| Platelet Aktive Edici Faktörün Oluşumu |
| İnflamasyonun Ortaya Çıkması ve Aktivasyonu (Endotelial hücre lökosit adezyon reseptörlerinin aktivasyonu; PMN lökositlerin ve monositlerin aktivasyonu; PMN lökositlerin adezyonu ve transmigrasyonu; Platelet aktivasyonu) |
| Mikroglial Hücre Aktivasyonu, Şekil Değişimleri ve Migrasyonu |
| Doku Hasarı |
| Ödem Oluşumu |
| Hüresel Şişme |
| İskemik Alanlarda Fokal "no-reflow" |
| Mikrovasküler Permeabilitenin Artışı |
| Kapiller Tomurcuk Oluşumu ile Anjiyogenez |
| Hücre Ölümü |
| Hemorajik Transformasyon |
| Akışkanlaşma ve Kavitasyon |

2.3.3. Serebral İskemi ve İnflamasyon

İnflamasyon, doğal ve adaptif immuniteye ait mekanizmaların birlikte yer aldığı bir immun reaksiyon olup, hücre hasarını başlatan zararlı etkenlerin azaltılarak, yok edilerek veya nötralize edilerek ortamdan uzaklaştırılmaya çalışıldığı; bu etkenler sebebiyle hasara uğrayan hücre ile dokuların onarım ve temizlenme sürecinin başlatıldığı koruyucu bir yanıttır (Kumar, Abbas & Aster, 2014). *Nöroinflamasyon* ise enfeksiyon, travma ve iskemi gibi eksternal yolla uyarılan beyin hasarından, yaşlanma ve metabolik anomalileri içeren sistemik değişikliklere kadar çeşitli inflamatuvar uyarılara yanıt olarak beyin dokusunda gerçekleşen moleküler ve hücresele değişiklikleri kapsamaktadır (Cai, 2013).

İnflamasyon sürecinde görev alan hücreler ve mediyatörler, normalde yalnızca zararlı uyarılara yanıt vermek için kısa süreli olarak aktive olurlar; uyarı uzaklaştırıldığı zaman inaktive olmaları ya da parçalanmaları sağlanarak yanıt kontrol altında tutulmaya çalışılır. Ancak bu inflamatuvar reaksiyonların şiddetli olması veya uzun sürmesi halinde, bazı kronik enfeksiyon ve inflamatuvar hastalıklarda olduğu gibi, kendi inflamatuvar yanıtı dokuya daha fazla zarar verebilmektedir (Kumar vd., 2014; Uyar, 2009).

KBB nöro-immun eksenin integral kısmı olup (Banks & Erickson, 2010); beyin homeostazını korur ve düzenler; sistemik dolaşımdaki dalgalanmaları dengeler. Menenjit, Multiple Skleroz, Alzheimer ve Parkinson Hastalığı, Epilepsi ve İnme gibi MSS ile ilişkili pek çok hastalığın, fonksiyonel bozukluğa yol açan KBB yıkımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. KBB yıkımı ile ilişkili mekanizmalar her ne kadar multi-faktöriyel olsa da, inflamasyon genellikle pre-dominant bir role sahiptir (Witt & Sandoval, 2014).

Post-iskemik nöroinflamasyon aracılı KBB yıkımı, ilerleyici ve interaktif bir süreçtir. Bu süreç, serebral ve periferel hücrelerden kaynaklanan sitokinler gibi pro-inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonuna, salınımına ve aktivasyonuna bağlıdır (Amantea vd. 2014).

Sitokinler, hedef hücrelerin aktivitelerini düzenleyen polipeptid, protein ve/veya glikoprotein yapıda immünomodülatörler olarak tanımlanan, pikomolar veya nanomolar konsantrasyonlarda etki gösterebilen küçük sinyal molekülleridir (Ramesh, MacLean & Philipp, 2013; Dembic, 2015). Hedef hücrelerdeki kendilerine ait spesifik ligandlara bağlan sitokinler, sinyal transdüksiyonu ve ikinci haberci sinyal iletimi yoluyla hematopoezin düzenlenmesi, hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, kemik formasyonu ve hücresele metabolizmanın düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylarda; özellikle immun ve inflamatuvar cevabın etkin mekanizmalarının büyük bir çoğunluğunda önemli rol oynarlar.

Oksidatif stres; mikroglia, lökositler ve nörovasküler birimin beyinde yerleşik hücreleri tarafından proteaz salınımı ve inflamatuvar sitokin üretiminin temel bir uyarıcısıdır. Deneysel araştırmalarda, inme ile ilişkili KBB yıkımında rolü olan anahtar patolojik mekanizmanın, çoğunlukla erken artış gösteren sitokinler, lökositlerin dolaşıma salınımı, hasar gören serebrovasküler sisteme lökositlerin adezyonu ve beyne infiltrasyonu, proteazların salınımı ve aktivasyonu vasıtasıyla gerçekleşen nöroinflamasyon-aracılı ekstraselüler matriks proteolizi olduğu öne sürülmektedir (Lo, Wang & Cuzner, 2002). Baskın bir rol oynayan bu lökosit-mikrodamar etkileşimleri ve iskemik beyine lökositlerin infiltrasyonu ile salınan serbest radikaller, sitokinler, kemokinler, lipid-türevi mediyatörler, histamin, bradikinin, serotonin ve proteazlar ödem, mikrovasküler permeabilizasyon ve hemorajik transformasyon ile sonuçlanan sekonder nörodejenerasyona aracılık etmektedir (Acosta, Tajiri, Hoover, Kaneko & Borlongan, 2015; Lo vd., 2002).

Kısaca, oldukça komplike bir süreç olan nöroinflamasyonda nöronlar, mikroglialar, astrositler, lökositler ve serebrovasküler endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinde, ayrıca ilgili reseptörler ve hücrel adezyon molekülleri gibi çeşitli faktörlerde farklılaşmalar ve/veya aktivasyonlar meydana gelerek, başlangıçta nörotoksik olan ortam ilerleyen süreçlerde nöroprotektif bir ortam haline dönüştürülmeye çalışılmaktadır (Lakhan, Kirchgessner & Hofer, 2009). Oluşan nörotoksitenin büyüklüğü bu noktada önem taşımaktadır. Bu nedenle, nörotoksik etkiye neden olan faktörlerin erken dönemde tespitinin ve kontrol altına alınabilmesinin, tedavi sürecinde önemli katkılar sağlayacağı açıktır.

2.3.3.1. Miyeloperoksidaz

Miyeloperoksidaz (MPO), 140 kDa molekül ağırlığına sahip hem-içeren, homodimer yapıda, güçlü pro-inflamatuvar ve pro-oksidatif özellikleri ile karakterize, mikrobisidal bir enzimdir; hidrojen peroksit oksidoredüktaz (EC 1.11.1.7) olarak sınıflandırılmıştır (Ray & Katyal, 2016). MPO glikolize yapıda, arjinince zengin, oldukça katyonik bir hemoproteindir (pI>10) ve negatif yüklü kompleks moleküllere bağlanabilir (Ray & Katyal, 2016). Her bir monomeri, bir ağır (55–64 kDa; 466 amino asit) ve bir hafif (10–15 kDa; 108 amino asit) alt ünitelerden meydana gelir; 5 α -heliks yapısından oluşan merkezi bir çekirdek ve kovalent bağlı bir hem grubu içerir (Lau & Baldus, 2006). MPO aktivitesi için optimum pH 5.5'tir, ancak yüksek hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tirozin konsantrasyonlarında geniş bir pH aralığında aktif kalabildiği belirtilmiştir (Ray & Katyal, 2016).

İnsan polimorfonükleer nötrofillerinde (PMN) bulunan en bol miktardaki proteinlerden biri olan MPO, hücre toplam proteinin % 5'ini oluşturur; ayrıca monositler, makrofajlar ve mikroglialar tarafından da eksprese edilir (Lau &

Baldus, 2006). Enzim, PMN ve monositlerin azurofilik granüllerinde depolanır; nötrofil aktivasyonu üzerine ekstraselüler boşluğa ya da fagozom içerisine salınır (Faurichou & Borregaard, 2003). MPO, NADPH oksidaz tarafından oluşturulan H_2O_2 ile reaksiyona girerek, bu oksidanın toksik potansiyelini artırır. H_2O_2 -MPO sistemi klorür, tirozin ve nitritin oksidasyonu yoluyla mikroorganizmaların membran yüzeylerine zarar verebilen hipokloröz asit (HOCl), diğer klorinasyon ürünleri, tirozin radikalleri ve reaktif azot ara ürünlerinin oluşumunu indükler (Faurichou & Borregaard, 2003). MPO kaynaklı bu oksidanlar, enzimin katalitik aktivitesi aracılığıyla, doku hasarına neden olan hücresel disfonksiyonu tetikler.

HOCl, beyinde MPO tarafından üretilen stabil fakat yüksek düzeyde reaktif, nörotoksik bir oksidan moleküldür (Ray & Katyal, 2016). HOCl, H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ (süperoksit radikali) ile reaksiyona girerek, sırasıyla, oldukça reaktif olan singlet oksijen ve hidroksil radikalini verir; bunun yanı sıra nitritle reaksiyona girerek, reaktif nitrit klorid oluşturur. Böylece daha geniş ölçüde doku hasarlarına neden olabilir. Yüksek kimyasal reaktivitesinin yanı sıra, plazma membranlarından difüze olarak Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz, Laktat Dehidrojenaz, Kreatin Kinaz, Hekzokinaz gibi çeşitli hücre içi enzimleri inaktive edebildiği; ATP ve NAD kaybı, laktat oluşumunun ve O_2 tüketiminin inhibisyonu gibi etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Schraufstatter vd., 1990). Çeşitli nöropatolojik koşullar altında, önemli miktarlardaki toksik HOCl, sürekli olarak periferik lökositler ve yerleşik makrofaj/mikroglialardan salınarak, beyin parenkimine difüze olmaktadır.

Hem damar duvarı ile yakın etkileşimleri hem de subendotelial boşluk boyunca dağılımı nedeniyle, vasküler hastalıklarda serbest MPO'nun proinflatuar özellikleri önemli görülmektedir. Damar duvarında HOCl ve NO_2^- gibi MPO-kaynaklı reaktif oksijen türleri, NO'nun katalitik tüketimi aracılığıyla gerçekleşen endotelial disfonksiyon ve aynı zamanda MPO'nun sitokin benzeri özellikleri, bu enzimin kardiyovasküler olaylarla yakın ilişkisinden sorumlu tutulmaktadır. MPO'nun, oksidatif etkisi üzerinden yalnızca damar duvarı hasarı oluşturmayıp, aynı zamanda lokal vasküler redoks durumunda ve hücresel sinyal mekanizmalarında önemli değişikliklere yol açtığı, böylece vasküler inflammatuar hastalıkların fenotipi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Lau & Baldus, 2006).

2.3.3.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa

İskemik inme sırasında, lezyon bölgesindeki iskemik çekirdekten penumbra alanına, lokal dokunun hasarına neden olabilen ve pro-inflatuar yanıtı artıran, çeşitli hasar-ilişkili moleküller salınmaktadır (Zhao vd., 2015a). Bu moleküllerden biri olan *Tümör nekroz faktör* (TNF, TNF- α) çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren pleotropik pro-inflatuar bir sitokindir. T-hücre reseptör

aktivasyonu, lipopolisakkarit, ultraviyole ışınlar ve viral enfeksiyonlar gibi aktive edici uyarılara yanıtta, çeşitli immün sistem ilişkili hücreler tarafından üretilmektedir. Düşük TNF düzeylerinin, metabolik ekzitotoksik hasarları takiben gerçekleşen nöronal ölümleri önlediği, astrositlerin ve nöronal progenitör hücrelerin proliferasyonunu indükleyerek, MSS'de hasar gören dokunun tamirinde ve rejenerasyonunda kritik bir öneme sahip olduğu belirtilmektedir (Wang, Czura & Tracey, 2003).

TNF ekspresyonu sıkı kontrol altındadır ancak çeşitli sistemik inflamatuvar hastalıklarda kontrolsüz düzeyde sentezlendiği belirtilmektedir. Yüksek TNF düzeylerinin hasara yanıtı aktive ettiği; hipotansiyona, diffüz koagülasyona ve doku hasarına aracılık ettiği bildirilmektedir (Wang vd., 2003).

Beyindeki TNF- α düzeylerinin, beyin hasarı ya da iskemi sonrasında, ayrıca nörodejeneratif hastalıkları olan kişilerde artış gösterdiği ve bu artışın büyük oranda aktive edilmiş mikroglialardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Fare beyin mikrovasküler endotelial hücrelerinin mikroglialar ile ko-kültüre edildiği bir *in vitro* çalışmada, beyin hasarına ya da nöroinflamasyona yanıt olarak, aktive mikroglialardan salınan TNF- α düzeylerindeki artışın, KBB yıkımını indüklediği ve ilerlettiği ileri sürülmüştür (Nishioku vd., 2010).

TNF'nin, bir büyüme faktörü olduğu belirtilen *İnterlökin-15* (IL-15)'in post-translasyonel sürecini hızlandırdığı yönünde bilgiler mevcuttur (Pan, Yu, Hsuchou, Khan & Kastin, 2009; Pan vd., 2013).

2.3.3.3. İnterlökin-15

İnterlökin-15 (IL-15), immün sistemde ve dışında çeşitli etkiler gösteren nöroprotektif bir sitokin olarak tanımlanmaktadır (Patidar, Yadav & Dalai, 2016). İnsanlarda IL-15 geninin serebellum, hipokampus, plasenta, iskelet kası, böbrek, akciğer, karaciğer ve pankreas dokularında; diğer sitokinlerden farklı olarak T hücreleri hariç olmak üzere; monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, epiteliyal ve iskelet kası hücreleri gibi pek çok hücre tipinde IL-15 gen ekspresyonunun gerçekleştiği belirtilmektedir (Patidar vd., 2016). Yapılan çalışmalarda IL-15'in beyinde özellikle nöronlardan; glial hücrelerden ise inflamatuvar yanıtı takiben dönüşüme uğradıklarında ya da aktive olduklarında, IL-15 eksprese ettiği yönünde veriler bulunmaktadır (Gomez-Nicola, Valle-argos, Pita-Thomas & Nieto-Sampedro, 2008).

İnterlökin-15'in pro-apoptotik faktörlerin down-regülasyonu ve anti-apoptotik faktörlerin ise up-regülasyonu yoluyla apoptozu önlediği, immün sistemle ilişkili çeşitli hücrelerin homestazı, gelişimleri ve fonksiyonlarında gerekli olduğu belirtilmektedir (Patidar vd., 2016). IL-15 aynı zamanda nörogenez, proliferasyon, farklılaşma ve nöronların kendilerini yenilemeleri,

nötrofil aktivasyonu gibi süreçlerde de önemli rol oynamaktadır. Araştırmalar IL-15'in, TNF sinyalini artıran ve düzenleyen yeni bir mediyatör olduğunu ortaya koymaktadır (Pan vd., 2009; Pan vd., 2013). Ancak MSS'deki rolü ile ilgili henüz yeterli bir bilgi bulunmamaktadır (Ransohoff & Benveniste, 2006).

2.3.3.4. İnterlökin-35

İnterlökin-35 (IL-35), 2007 yılında anti-inflamatuar ve immun-baskılayıcı özellikler taşıdığı belirtilen, yeni bir sitokin olarak tanımlanmıştır. Kodlayan gen transkripsiyonunun proinflamatuar sitokinler ile aktive edilen monositlerde, vasküler endotelial hücrelerde ve düz kas hücrelerinde gerçekleştiği bildirilmektedir (Banchereau, Pascual & O'Garra, 2012).

Başlangıçta IL-35'in yalnızca regülatör T hücreleri tarafından üretildiği düşünmüştür, ancak daha sonraki çalışmalarda, IL-35 üreten ve iTr35 olarak adlandırılan yeni bir T hücre popülasyonunun gelişimini indüklediği gösterilmiştir (Sun, He, Nair, Yeung & Egwuagu, 2015). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, B hücrelerinin de IL-35 üreterek özellikle otoimmün ve enfeksiyöz hastalıklarda düzenleyici bir fonksiyon gösterdikleri (Sun vd., 2015) ve IL-35'in çeşitli hastalıklarda immunmodülatör olarak rol oynadığı bildirilmektedir (Vignali & Kuchroo, 2014).

Literatürde, iskemik inme hastalarında, IL-35 düzeylerine dair herhangi bir bilgi yer almamaktadır.

2.3.4. Serebral Hasar ve Progranulin

Yaklaşık 6 kDa molekül ağırlığında peptidler olan Granulinler, yüksek oranda korunmuş, sistein içeren bir yapısal motife sahiptirler (Bateman & Bennett, 1998; Ong & Bateman, 2003). Bilinen bütün memeli granulinlerinin, 593 amino asitten oluşan, yaklaşık 68.5 kDa ağırlığında, glikoprotein yapıda bir büyüme faktörü olan ve *Progranulin* (*PGRN*) olarak adlandırılan, ortak öncül bir molekülden meydana geldiği belirtilmektedir (Ghidoni, Paterlini & Benussi, 2012; Priyanka vd., 2013).

Progranulin gen ekspresyonunun, memelilerde ve kemirgenlerde beyin, dalak, plasenta, over, epididim, adrenal bez, akciğer, karaciğer, kalp, iskelet kası, adipoz doku gibi çeşitli organ ve dokularda gerçekleştiği bilinmektedir (Jian, Konopka, Liu, 2013; Daniel vd., 2000).

Yapılan çeşitli çalışmalarla embriyogenez, yara iyileşmesi, kanser ve inflamasyon gibi süreçlerde rol oynadığı gösterilen PGRN'nin (He, Ong, Halper, Bateman, 2003; Jian vd., 2013; Göbel vd., 2013), güçlü nörotropik ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu, çeşitli hasar türlerinde

nöroprotektif etki gösterdiği ve KBB'nin gelişiminde rol oynayan bazı yollarla ilişkili olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (Jian vd., 2013; Jackman vd., 2013; Gass vd., 2012). İnflamasyonla ilişkili olarak, PGRN'nin makrofajik hücrelerde, TNF- α ve IL-1 β gibi bazı sitokinlerin ekspresyonlarını artırdığı yönünde bilgiler mevcuttur (Okura vd., 2010).

Endojen PGRN eksikliğinin serebral mikrodamarların yapı ve işlevlerinde değişikliklere neden olduğunu ve beyin KBB yıkımına olan hassasiyetini artırdığını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; PGRN knock-out farelerde yapılan bir orta serebral arter oklüzyonu çalışmasında, farelerin iskemik beyin hasarına karşı yüksek hassasiyet gösterdikleri gözlemlenmiştir (Jackman vd., 2013). Aynı çalışmada, farelerde iskemik bölgedeki hemoraji alanında, kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış olduğu; endotelial bağlantı komplekslerinin morfolojisinde belirgin değişimler meydana geldiği; sıkı bağlantı yarıklarının gelişimsel olarak daha kısa olduğu ve bu durumun sıkı bağlantılar aracılığıyla sağlanan fiziksel bariyerin büyüklüğünde azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir.

Son yıllarda, PGRN'nin serebral hasar ile ilişkisine yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir, ancak inme sürecindeki rolü ve etki mekanizması henüz açığa kavuşturulamamıştır.

2.3.5. Serebral Hasar ve Nöron Spesifik Enolaz

Enolaz (2-fosfo-D-gliserat hidrolaz) (EC 4.2.1.11), glikolitik yolda 2-fosfo-D-gliseratın fosfoenolpiruvata dehidrasyonunu katalizleyen, sitozolik bir metalloenzimdir. Omurgalılarda enolazın farklı genlerden eksprese edilen 3 izoenzimi bulunmaktadır; enolaz α yaygın bulunan formudur; enolaz β kaslara ve enolaz γ ise nöronlara spesifiktir. Bilinen tüm ökaryotik enolazlar dimerik yapıdadır (Isgro, Bottoni & Scatena, 2015).

Beyinde, Non-Nöronal Enolaz (NNE; $\alpha\alpha$ -dimer) ve Nöron-Spesifik Enolaz (NSE; $\gamma\gamma$ - ve $\alpha\gamma$ -dimer) izoenzimlerinin ekspresyonları gerçekleştirilmektedir. NNE'nin, immunositokimyasal çalışmalar sonucunda, sinir dokusunda glial lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır ve bu nedenle non-nöronal (nöronal olmayan) enolaz olarak adlandırılmıştır. NSE, her biri 39.000 bağıl moleküler kütleyle sahip iki γ -alt biriminden oluşan en asidik beyin enolazıdır; NNE ise her biri 43.500 bağıl moleküler kütleli olan iki α -alt biriminden oluşan, en az asidik enolaz izoenzimidir (Marangos, Zis, Clark & Goodwin, 1978). NNE'nin klorür iyonlarına, üre ve sıcaklığa oldukça duyarlı olduğu; buna karşın NSE'nin, klorür-indüklü inaktivasyona karşı daha stabil kaldığı belirtilmektedir (Isgro vd., 2015).

İmmun-boyama teknikleri kullanılarak yapılan analizlerle, NSE'nin granül hücreleri, purkinje hücreleri, projeksiyon nöronları, duysal ve otonomik nöronlar gibi nöron tiplerinde bulunduğu; ayrıca pinealositler, hipofiz bezinin peptid-salgilayan hücreleri, tiroid parafoliküler hücreleri, adrenal medulla kromafin hücreleri, Langerhans adacıkları hücreleri, deride Merkel's hücreleri, akciğer nöroendokrin hücreleri ve eritrositler gibi çeşitli hücrelerde varlığı gösterilmiştir (Isgro vd., 2015). Küçük hücreli akciğer kanseri ve nöroblastoma gibi nöroendokrin malignitelerin bir belirteci olarak kullanılması nedeniyle, sinir dokularına özgüllüğüne şüpheli yaklaşılmaktadır (Sahu, Nag, Swain & Samaddar, 2017). Malign proliferasyonda NSE ekspresyonunun arttığı ve serum düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Bu nedenle ilgili kanser teşhis, evreleme ve tedavisinde değerli bir tümör belirteci olarak da kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Sitoplazmik bir enzim olması; spinal sıvı, serum ve idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunması ve yarılanma ömrünün uzun olması gibi nedenlerden dolayı, hücrelerin turnover ve değişen metabolizması üzerinden hastalıklarla ilişkili diagnostik bilgiler vermesi açısından, önemli bir klinik belirteç olduğu vurgulanmaktadır (Isgro vd., 2015).

Serebral doku hasarının göstergesi olarak, NSE'nin iskemik inmeyi takiben nöronlardan kan dolaşımına salındığı bilinmektedir. Akut iskemik inmeli hastalarda infarkt hacmi ve inmenin şiddeti ile NSE düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu ve iskemik inmenin ilk birkaç günü içinde serum NSE düzeylerinin takibinin, erken fonksiyonel nörolojik sonlanım için prediktif açıdan değerli olabileceği düşünülmektedir (Zaheer vd., 2013; Oh vd., 2003). NSE düzeylerinin hemoraji ve travmatik beyin hasarı gibi diğer nörolojik bozuklukların teşhisi ve sonlanım açısından değerlendirilmesinde yararlı bir biyobelirteç olabileceğini bildiren araştırmalar bulunmaktadır (Cunningham vd., 1996; Cheng, Yuan, Yang, Wang & Liu, 2014).

2.4. Beyinde Klirens Sistemi

Lenfatik sistem, protein homeostazının korunması ve immun sistemin düzenlenmesinde, gerekli fizyolojik işlevleri yerine getiren; interstisyum, lenfatik damarlar, lenfatik organlar ve göç eden çeşitli hücrelerden oluşan bir sistemdir (Iloff, Goldman & Nedergaard, 2015). Bu sistem ile, interstisyuma geçen ve kan kapillerine geçemeyen plazma proteinleri ve büyük molekülü maddeler, büyük venlere aktarılarak, kan dolaşımına geri döndürülmektedir (Arifoğlu, 2017). Genel olarak, lenf sıvısının dokulardan venöz sisteme iletilmesi; lenf sıvısından yabancı maddelerin ve bakterilerin fagositozu; antikor üretimi, lenfosit üretimi ve depolanması; sindirim sisteminden yağ ve diğer besinlerin emilimi gibi işlevleri olan lenfatik sistem, vücutta özellikle bir drenaj sistemi oluşturması bakımından önem taşımaktadır (Arifoğlu, 2017).

Lenfatik sistem, kardiyovasküler sistem gibi sıvı hareketini sağlayan bir sistem olmasına rağmen, merkezi bir pompaya sahip olmaması ile farklıdır (Aktümsek, 2015). Bunun yerine, lenf sıvısının lenf nodüllerine ve venöz dolaşıma akışını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Örneğin; lenf damarları etrafındaki çizgili kasların kontraksiyonu; kan kapillerinden süzülen sıvının doku aralıklarındaki filtrasyon basıncını yükseltmesi; lenf damarı etrafındaki arterlerin pulsasyonu ve baskısı; solunum hareketleri; lenf damarlarının açıldığı venlerdeki negatif basınç ve sempatik etki ile lenf damar çeperindeki düz kasların kasılması, gibi (Arifoğlu, 2017).

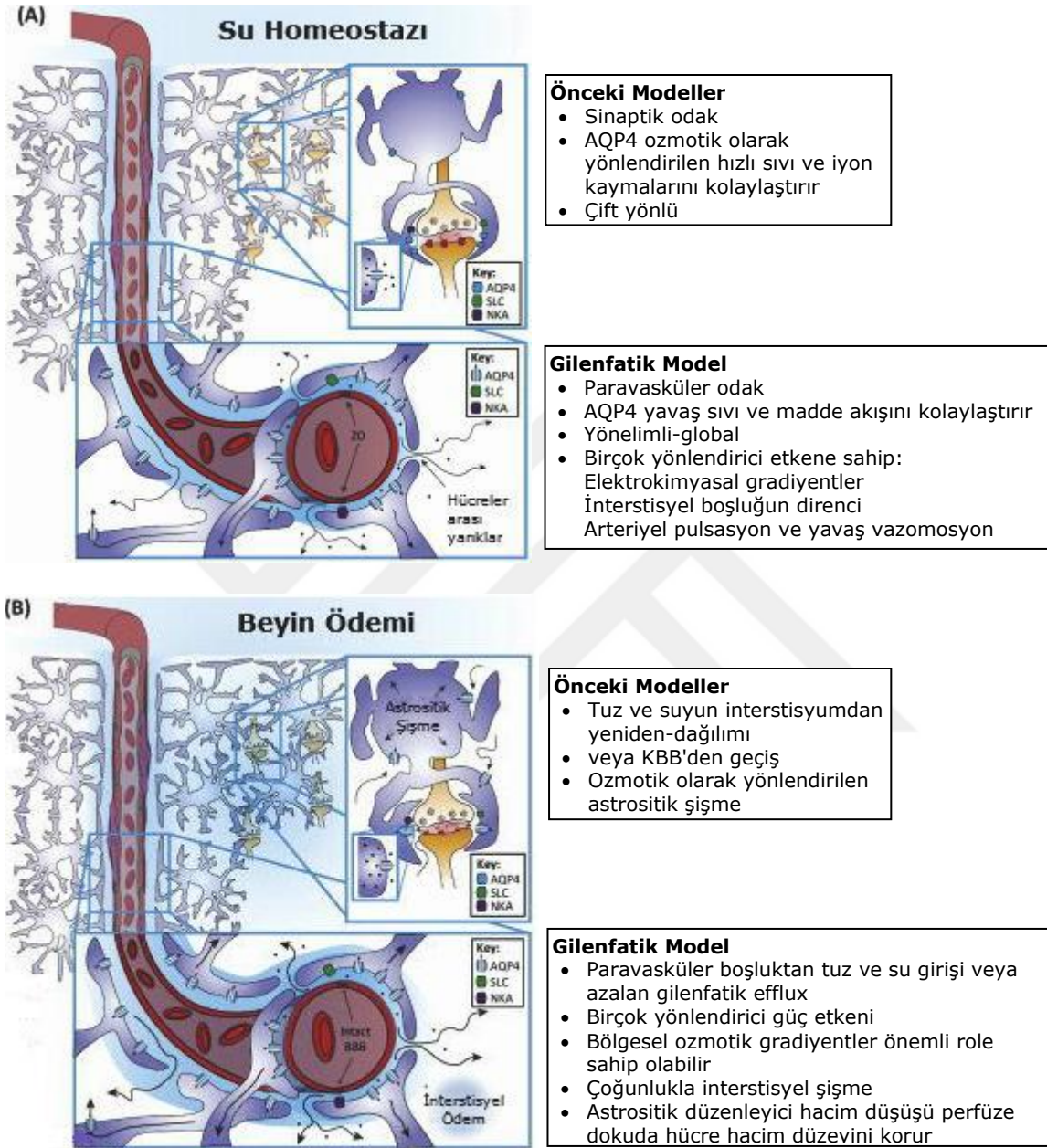
Beyin dokusu, yüksek metabolik hız ile karakterize olmasına ve sinaptik iletim mikroçevresindeki değişikliklere yüksek duyarlılığına rağmen, MSS klasik lenfatik damarlardan yoksundur. Uzun yıllar, BOS dolaşımının, MSS'de üretilen KBB'den kolaylıkla elimine edilemeyen metabolik atıklar için bir atık kanalı işlevi gördüğü kabul edilmiştir. 1914 yılında Weed tarafından yapılan bir çalışmada, günümüze kadar büyük oranda değişmeden kalmış bir BOS geri emilim modeli ortaya konulmuştur. Bu modele göre BOS, subaraknoid boşluktan araknoid villuslar yoluyla dural sinüslere, kranial sinirleri çevreleyen perinöral boşluklar boyunca boyna ve nazal mukozanın periferik lenfatik damarlarına gidebilmektedir (Weed, 1914; Iliff vd., 2015). Aynı çalışmada, BOS'un serebral venlere veya kapillere kaçtığına dair herhangi bir kanıt bulunamadığı bildirilmiştir.

Yeni araştırmalar, bu uzun zamandır devam eden inancın aksine beyinde, beyin yüzeyi ile kafatası arasındaki membranda bulunan venöz yapılar olan dural sinüslerle ilişkili lenfatik damarların rol oynadığını göstermektedir (Iliff vd., 2015). Serebral arterleri çevreleyen perivasküler alanlar boyunca, subaraknoid BOS'un beyin interstisyumu içine ve üzerinden resirküle edildiğini; buna karşılık interstisyel çözünen maddelerin, büyük kapasiteli drene eden venleri çevreleyen perivasküler kanallar boyunca beyinden temizlendiği belirlenmiştir. Perivasküler BOS resirkülasyonu ve interstisyel çözünür madde klirensi, kısmen astroglial araçlar tarafından sağlandığından ve astroglial su kanalı akuaporin-4'ü gerektirdiğinden dolayı, interstisyel çözünür madde klirensi için bu yol *Gilenfatik Sistem* (Glymphatic System) olarak adlandırılmıştır (Iliff vd., 2015).

Gilenfatik Sistem, MSS'den çözünür proteinlerin ve metabolitlerin etkili bir şekilde yok edilmesini kolaylaştırmak için astroglial hücreler tarafından oluşturulan, benzersiz bir perivasküler tünel sistemini kullanan, özellikle uyku sırasında aktif olan ve yakın zamanda keşfedilen makroskopik bir atık temizleme sistemidir. Bu sistem, atık eliminasyonun yanı sıra glukoz, lipidler, amino asitler, büyüme faktörleri ve nöromodülatörler gibi çeşitli bileşiklerin beyinde dağılımını kolaylaştırmaktadır (Jessen vd., 2015).

Gilenfatik akışı yönlendiren konvektif kuvvetlerin, sadece hidrostatik basınç farklılıklarından değil, aynı zamanda elektrokimyasal, termal ve yer çekimi ile ilgili gradientlerin bir sonucu olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir (Thrane, Thrane, Plog & Nedergaard, 2015). Gilenfatik akışı yönlendirebilecek diğer kuvvetler, BOS ve İSS arasında var olan büyük doğrudan akım ve değişen kafa pozisyonu ile birlikte yer çekiminin etkilerini kapsamaktadır. Ayrıca, BOS kompartman basıncını düşürerek veya BOS üretimini baskılayarak, gilenfatik akışı ve endojen çözünen maddelerin klirensini önemli ölçüde azalttığı için, sürekli BOS salgılanması ve BOS basıncı dalga biçiminin de etkili olabileceği düşünülmektedir (Thrane, 2015).

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarla, gilenfatik modelin su homeostazı ve beyin ödemindeki rolüne ilişkin önceki modellerden olası farklılıkları açıklanmaya çalışılmıştır (Thrane vd., 2015). Buna göre gilenfatik modelde, çözünen madde ve su akışının astrosit uç-ayakları boyunca, konveksiyon olarak adlandırılan yönelimli büyük hacimli sıvı hareketini kapsadığı önerilmektedir. Dolayısıyla, gilenfatik akış, paravasküler boşluktan tuz ve suya oldukça geçirgen olan astrosit uç-ayak membranı boyunca ilerlemekte ve beyin interstisyumuna hareket eden bazı itici güçlerin ya da gradientlerin net sonucunu yansıtmaktadır (örneğin hidrostatik, ozmotik, elektrostatik gibi) (Şekil 2.9A). Ödem sırasında gilenfatik modelde, beyne net sıvı ve çözünen madde girişinin vasküler (kan) yerine, paravasküler (BOS) kaynaklı olabileceği; bazı yönlendirici güçlerin su girişini kolaylaştırabileceği veya dışarı yönde gilenfatik akışı azaltabileceği öne sürülmektedir (Şekil 2.9B). Gilenfatik sistemin beyin ödeminde önemli rollere sahip olduğu, diagnostik görüntüleme ve terapötikler için yeni hedef yollar açabileceği düşünülmektedir (Thrane vd., 2015). Ancak gilenfatik sistem ile ilişkili mekanizmalar henüz netliğe kavuşmamıştır.



Şekil 2.9. Gilenfatik modelin önceki modellerden farklılıkları.

Çözünebilir atıkların beyinden uzaklaştırılması ile ilgili, birbiriyle kesişen çeşitli klirens sistemleri tanımlanmıştır (Tarasoff-Conway vd., 2015). Bu sistemler arasında *Degradasyon Klirensi*, *KBB-Klirensi*, *BOS Absorbsiyon Klirensi* İSS ve *Büyük Hacim Akışı Klirensi* yer almaktadır (Tablo 2.3).

Degradasyon Klirensi, proteinlerin ekstraselüler ve intraselüler enzimatik degradasyonu ile ilişkilidir. İSS proteinlerinin ekstraselüler degradasyonu, astrositler gibi hücreler tarafından salgılanan ve eksprese edilen proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. İSS proteinleri, nöronlarda veya glialarda intraselüler olarak yıkılarak, ekstraselüler boşluktan alınabilir. Proteinlerin intraselüler degradasyonu übikuitin-proteazom, otofaji-lizozom ve endozom-lizozom yolları aracılığıyla gerçekleşmektedir.

KBB-Klirensi, interstisyel proteinlerin beyin endotelinde lokalize olan özel transport sistemleri aracılığıyla, KBB'den doğrudan kana temizlenmesidir.

İSS Büyük Hacim Akışı Klirensi, İSS proteinlerinin, BOS atık kanalına veya perivasküler boşluğa giren büyük hacim akışı aracılığıyla, doğrudan BOS'a temizlenmesidir; perivasküler drenaj ve gilenfatik yolları kapsamaktadır (Tarasoff-Conway vd., 2015). Molekül göçünün, statik bir substrat içinde molekülün hareketi tarafından yönlendirildiği difüzyondan farklı olarak, büyük hacim akışının göçü, sıvı substratın kendisinin hareketi tarafından yönlendirilir. Büyük hacim akışının önemli bir özelliği, süspansiyon partiküllerin göç hızının yalnızca sıvı substrat göçünü yönlendiren kuvvetler tarafından belirlenmesidir. Bu nedenle difüzyondan farklı olarak çözünen maddenin hidrodinamik yarıçapından bağımsızdır. Ekstraselüler ödem üzerine yapılan çalışmalarda, ödem sıvısının da parenkimden difüzyon yerine büyük hacim akışı ile yayıldığı; kitle etkisi ve iyon transportundaki düzensizlikler yoluyla meydana getirilen hidrostatik ve ozmotik kuvvetler tarafından yönlendirildiği belirtilmiştir (Stokum vd., 2016).

BOS Absorpsiyon Klirensi ise proteinlerin beyinden, İSS'den BOS'a klirensi takip ederek temizlenmesidir (Tarasoff-Conway vd., 2015).

Tablo 2.3. Beyindeki Klirens sistemleri (Tarasoff-Conway vd., 2015)

| Klirens Sistemi | Kaynak | Hedef | Klirens Sistemini Etkileyen Faktörler | Klirens Yolakları |
|--|---------------------|--|---|--|
| <i>KBB Klirensi</i> | İnterstisyel sıvı | Kan | Transporter ekspresyonu ve aktivitesi, Ligand aktivitesi ve yarışma, Vasküler bütünlük | Efflux taşıyıcıları ve mediyatörleri İnflux taşıyıcıları ve mediyatörleri |
| <i>Degradasyon Klirensi</i> | | | | |
| İntraselüler | İntraselüler boşluk | Degradasyon | Enzim ekspresyonu ve aktivitesi, Ligand afinitesi ve yarışma, İntraselüler degradasyon yollarının başlaması | Übikitin-proteazom yolağı Otofaji-lizozom yolağı Endozom-lizozom yolağı Proteazlar |
| Ekstraselüler | İnterstisyel sıvı | Degradasyon/ Hücre alım | Enzim ekspresyonu ve aktivitesi, Ligand afinitesi ve yarışma, Hücre alımın aktivasyonu | Proteazlar Glial fagositler |
| <i>İnterstisyel Sıvı Büyük Hacim Akışı Klirensi</i> | | | | |
| BOS Atık Kanalı | İnterstisyel sıvı | BOS atık kanalı (subaraknoid boşluk, ventriküller) | İntrinsic interstisyel sıvı akış hızı | İnterstisyel, BOS atık kanalı içerisine efflux |
| Perivasküler Drenaj | İnterstisyel sıvı | Periarteriyel boşluktan periferik lenfe | Apolipoprotein E ε4 aleli, İmmun kompleks depozisyonu, Arteriyel yaş, Arteriyel pulsasyon (hipopetik) | Kapiler ve arteriyel duvarların bazal membranına İSS dışı atımı |
| Perivasküler Gilenfatik | İnterstisyel sıvı | Perivenöz boşluktan periferik lenfe veya ventriküllere | Moleküler büyüklük, Arteriyel pulsasyon, Aquaporin-4 ekspresyonu-lokalizasyonu, Uyku | Periarteriyel boşluğa BOS içe alımı İnterstisyum içerisinde BOS-İSS değişimi Perivenöz boşluk boyunca BOS-İSS dışı atımı |
| <i>BOS Absorbsiyon Klirensi</i> | | | | |
| Sirkülatuar | BOS | Kan | BOS üretimi, Kan-BOS bariyeri transportörleri, Araknoid villus resistansı | Araknoid villus bütünlüğü Kan-BOS bariyeri dışı atımı Transporter ve mediyatörlerin içe alımı |
| Lenfatik | BOS | Periferik lenf | BOS'un lenfatik absorpsiyonu | Perivasküler boşluk Perinöral boşluk |
| Lenfatik Damarlar | BOS | Lenf | Bilinmiyor | Meninjeal lenfatik damarlara subaraknoid BOS |

2.5. Beyin Ödemi ve Tipleri

Beyin ödemi, beyin dokusunun volümetrik büyümesine yol açan, beyin parenkimindeki anormal düzeyde sıvı birikimi olarak tanımlanmaktadır (Klatzo, 1994). Beyin hidromineral dengesi, KBB ve hücre membranlarından sıvı alışverişlerine dayanmaktadır; parenkimde hücre membranlarından ozmotik gradiyentlerle yönlendirilen çift yönlü bir sıvı aktarımı söz konusudur (Jia, 2016). Bu ozmotik gradiyentlerin, su transportunu sağlayan temel gücü oluşturduğu ve regülasyonlarının çok sayıda iyon transportının koordineli faaliyetini gerektirdiği belirtilmektedir. Bu transportlar arasında 1) Voltaj kapılı Na^+ ve K^+ kanalları, Epitelial Na^+ kanalları, Geçici reseptör potansiyel kanalları, Ca^{+2} salınımıyla aktive edilen Ca^{+2} kanalları; 2) Na^+/Cl^- -ko-transportları, $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ ve su ko-transportları (NKCC), Na^+/H^+ değiştiriciler (NHE), $\text{Na}^+/\text{glukoz}$ ko-transportları, Glutamat transportları (GLT) ve 3) Na^+/K^+ -bağımlı ATPaz yer almaktadır. Bu iyon transportlarının aktivitelerinde meydana gelen disfonksiyonların, hidromineral homeostazın bozulmasına yol açtığı ve bu durumun iskemik inmede beyin ödemi oluşumunun temelini oluşturduğu ileri sürülmektedir (Jia, 2016).

Sıçanlarda iki saat süre ile orta serberal arter oklüzyonu yapılan bir çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarı süreci ile ilişkili analizler sonucunda elde edilen verilere göre, AQP4 ekspresyonunun upregülasyonu (2 saat), astrositik uç-ayaklardaki şişme sonucu oluşan mikrovasküler daralma (2-6 saat), infarkt ve ödem progresyonu, KBB yıkımı (6-24 saat), nötrofil infiltrasyonu ve mikroglia aktivasyonu (24 saat) gibi hasarla ilişkili olayların meydana geldiği gösterilmiştir (Kurusu vd., 2016). Bunlar arasındaki en dramatik ve kritik olan olay, beyin su içeriğinin artmasıdır. Bu durum, İKB'nin artmasına, serebral kan akışında azalmaya, serebral herniasyona ve ölüme yol açabilmektedir (Jia, 2016).

Ödem oluşumu sırasındaki kapiller endotelial hücreler boyunca gerçekleşen sıvı hareketinde, hidrostatik ve ozmotik kuvvetlerin rolü, 1896'da İngiliz fizyolog Ernest Starling tarafından açıklanmıştır (Starling Denklemi) (Simard, Kent, Chen, Tarasov & Gerzanich, 2007; Stokum vd., 2016). Bu modele göre, ödem oluşumu iki faktöre ihtiyaç duymaktadır: 1) dokuların içine ya da dışına "iten" ya da "çeken" yürütücü bir kuvvet; 2) bu maddelerin transkapiller akışına aracılık eden bir "geçirgenlik poru" (Stokum vd., 2016). Starling denkleminde, sıvının hareketi: Kapiller hidrostatik basınç (P_C), İnterstisyel hidrostatik basınç (P_I), Kapiller ozmotik basınç (π_C), İnterstisyel ozmotik basınç (π_I) ve bir Filtrasyon katsayısı (K_f) (kapiller membran için geçirgenlik sabiti) olmak üzere beş değişkene bağlıdır (Simard vd., 2007).

Starling'in bu ilkesi, serebral ödem oluşum mekanizmalarını yansıtmak için, 2007'de yeniden formüle edilmiştir ve geçirgenlik katsayısı (K), suyun transkapiller çıkışını (J_v) hesaba katmak için, net hidrolik geçirgenlik (K_H) ve net ozmotik geçirgenlik (K_O) olmak üzere iki sabite ayrılmıştır (Stokum vd., 2016).

$$J_v = K_O(\pi_c - \pi_i) + K_H(P_c - P_i) \quad (\text{Starling Denklemi})$$

Denklem, net filtrasyon veya net sıvı hareketini (J_v) verir; dışarı yönde kuvvet pozitifdir, bu da sıvının kapillerden ayrılma eğiliminde olduğu anlamına gelmektedir (Simard vd., 2007). Filtrasyon katsayıları olan K_H ve K_O , ödem oluşumunu belirler. Sıvı hareketi için itici güçlerin iskemik beyin tarafından oluşturulmadığı; bunun yerine, hidrostatik basıncın (P) kalp tarafından meydana getirildiği ve ozmotik basıncın (π) ise iskemi başlangıcından önce varolan elektrokimyasal gradiyentlerde depolanan potansiyel enerjiden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Simard vd., 2007).

Starling'in prensibine göre, itici gücün, hidrostatik ve ozmotik basınç gradiyentlerinin toplamı olduğunu belirtilmektedir. Doku basıncı (P_i), İSS hacminin ve doku kompliyansının bir fonksiyonu iken; kapiller hidrostatik basınç (P_c) ise pre-kapiller arterioler basınç, post-kapiller venüler basınç ve kapiller direnci belirler (Stokum vd., 2016). Ozmotik kan (π_c) ve İSS (π_i) basınçları, her biri içindeki süspansiyon partikül miktarının bir fonksiyonudur. İtici kuvvetlerin bir sıvı akışı oluşturabilme yeteneği, KBB'nin net hidrolik (K_H) ve net ozmotik (K_O) iletkenliklerine (geçirgenlik porlarına) bağlıdır. Sağlıklı dokularda hem ozmotik terim [$K_O (\pi_i - \pi_c)$] hem de hidrostatik terim [$K_H (P_c - P_i)$] sifıra yakındır ve net su akışı minimaldir (Stokum vd., 2016).

Altında yatan patolojileri ile karakterize edilen *Sitotoksik*, *Transvasküler* (*İyonik* ve *Vazojenik*) ve *Peri-Hematomal* olmak üzere çeşitli serebral ödem türleri tanımlanmıştır. İskemi sürecinde özellikle sitotoksik ile vazojenik ödem ön plandadır (Wykes & Vindlacheruvu, 2015).

Sitotoksik ödem (onkotik hücre şişmesi), her ne kadar ödem olarak adlandırılrsa da, hücre dışından ziyade hücre içi sıvı birikimi ile sonuçlanır ve hücre dışı iyonik ödem için premorbid bir prekürsör olarak kabul edilir. Transvasküler serebral ödem hasar vericidir; çünkü beyin dokusunun şişmesi ile kendini gösterir. Şişme, belirli bir doku kitlesinin hacimsel olarak büyümesi olarak tanımlanır ve tümör, ödem veya kan birikimi yoluyla oluşabilir (Stokum vd., 2016).

İnmede sitotoksik ödem, beyinde hidromineral denge bozukluğunun en erken klinik tablosudur. Ozmolitlerin (Na^+ , Cl^- gibi) içeri yönde akışı ve interstisyel boşluklardan suyun hücre içi kompartmana akması nedeniyle,

hücre şişmesi ve ekstraselüler boşluğun azalması ile sonuçlanan premorbid bir süreçtir (Jia, 2016, Stokum vd., 2016). Serebral ödemin ve şişmenin meydana gelebilmesi için, dokunun bir sıvı kaynağı ile perfüze edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Stokum vd., 2016). Dolayısıyla sitotoksik ödem, parenkimal su kitlesinin yeniden düzenlenmesini temsil ettiği ve beyne yeni bir su kitlesi ilavesi içermediği için, esasen doku şişmesi oluşturmaz. Bununla birlikte, şişmeye, neden olan iyonik ve vazojenik gibi ödem türlerinin gelişimine yol açan itici gücü oluşturduğundan dolayı, serebral ödem ve şişme oluşumunda önemli bir başlangıç basamağı olarak görülmektedir (Stokum vd., 2016).

Ozmolitlerin hücresel içeri yönde akışı, primer aktif veya sekonder aktif transport yoluyla oluşabilir. Primer aktif transport, Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz gibi pompalar için enerji sağlamak üzere, sürekli bir ATP temini gerektirir. Sekonder aktif transport, daha önce primer aktif transport vasıtasıyla üretilen ve transmembran iyonik gradientlerde depolanan, potansiyel enerjiden yararlanır. Sekonder aktif transporterlar, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -kotransporter ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştirici gibi iyon kanalları ve kotransporterlerini kapsar (Stokum vd., 2016).

Astroditler, ekstraselüler sıvı kompozisyonunun kabul edilebilir değer aralıklarında tutulmasını sağlayan, güçlü homeostatik mekanizmalara sahiptir. Hasar oluşumunu takiben, normal olarak İSS'de mevcut olan bazı moleküller, büyük ölçüde konsantrasyon artışı gösterir. Bunun üzerine astroditler, çözünen madde transportunu yönlendiren ve normalde yararlı olan çeşitli sekonder aktif transporterleri aktive ederek, İSS homeostazını korumaya çalışırlar. Ekstrem koşullarda, bu sekonder aktif transport mekanizmalarının aşırı düzeyde aktivasyonu meydana gelerek, Na^+ ve suyun içeri yönde kitlesel akışına ve sitotoksik ödeme yol açar. Sitotoksik ödemin tüm mekanizmaları aşırı Na^+ yüklenmesini kapsar. Bu durum, astroditlerdeki hacim regülasyonunu bozmak için yeterlidir (Stokum, Kurland, Gerzanich & Simard, 2015; Stokum vd., 2016).

İSS'de K^+ konsantrasyonu normalde 2.7-3.5 mM arasında değişir. Birçok tipteki MSS hasarını takiben, ekstraselüler K^+ , Na^+/K^+ -ATPaz yetmezliği, enerji tükenmesi, hücre zarının rüptürü veya glutamat eksitotoksitesinin bir yan ürünü olması gibi nedenlerden dolayı, bazen yaklaşık 60 mM gibi tehlikeli düzeylere ulaşabilir (Gido, Kristian & Siesjo, 1997). Sağlıklı beyinde astroditler, benign astrodit şişmesile ilişkili bir fonksiyon olan, aşırı düzeydeki ekstraselüler K^+ iyonunu temizlemeye çalışırlar. Buna ilaveten, ekstraselüler K^+ iyonunun önemli ölçüde arttığı koşullarda, K^+ klirensi sitotoksik ödem oluşumunu tetikler (Stokum vd., 2016).

Sitotoksik Ödem'de, KBB bozulmadan hücre şişmesi meydana gelmektedir. İskemi sonrası oluşan hipoksi (kan akımı<12mL/100gm/dk) ve buna bağlı Na/K-ATPaz pompasının bozulması sonucu oluşmaktadır. Bu süreçte hücre içine sodyum girişi, hücre dışına potasyum çıkışı olmaktadır ve bunu pasif difüzyonla hücre içine su girmesi takip etmektedir. Ekstraselüler alanda su miktarında azalma ve beyin tüm hücrel elemanlarında (glia, nöron, endotel) şişme meydana gelmektedir (Kumral, 2001).

Sitotoksik serebral ödem, en sık, travmatik beyin hasarı veya inmeye sekonder serebral iskemiye takiben görülmektedir ve büyük çoğunlukla gri cevheri etkilemektedir (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Normal fizyolojik koşullar altında, enerji bağımlı Na⁺/K⁺-ATPaz pompası hücre dışı yüksek ve hücre içi düşük Na⁺ iyonu konsantrasyonundan sorumludur. İskemi hasarından sonra, hücreler bu iyon pompalarının sürekliliğini sağlayamaz ve hücrelerde Na⁺ iyonları birikir. Ortaya çıkan ozmotik gradient, hücre dışı boşluktan suyu çekerek, hücre içi ödeme ve hücrenin şişmesine neden olur (Kumral, 2001). Eksitator nörotransmitter glutamat salınarak, kalsiyum akışı, eksitotoksikite ve sonuçta hücre ölümüne neden olan kalsiyum iyonuna geçirgen NMDA reseptör aktivasyonuna yol açar (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Bu nedenle iskemi etkisi altında, nörovasküler birimdeki endotel, nöron ve astrosit gibi hücreler, hücre içi yüksek ozmolaliteye sahiptir ve reperfüzyon ya da reoksijenasyon sırasında hücrel şişme yaşarlar. Bu hücrelerin şişmesi, daha sonra oluşan, ani hücre dışı şişme olayının temelini oluşturur (Jia, 2016).

İyonik ödem sırasında, sitotoksik ödem sonucu meydana gelen trans-endotelial Na⁺ gradientinin içerdiği potansiyel enerji, ozmolitlerin ve suyun ekstrasvazasyonunu yönlendirir. Na⁺, beyin endotelial hücreleri tarafından konsantrasyon gradienti boyunca içeri doğru taşınır. Bu durum beyin parenkiminde Na⁺ birikmesi ve bir ozmotik itici kuvvetin oluşumuyla sonuçlanır. Na⁺ girişi, kan perfüzyonunu gerektirir. Cl⁻ ve su, elektriksel ve ozmotik tarafsızlığı korumak için içeri doğru Na⁺ 'yı takip eder ve bu da iyonik ödem oluşumu ile sonuçlanır. İyonik ödem esas olarak, kapiller yatağın oldukça ince duvarları ve geniş yüzey alanı nedeniyle, kapiller düzeyde oluşabilir (Stokum vd., 2016).

İyonik ödem oluşumu için Na⁺, Cl⁻ ve su beyin kapiller endotelial hücrelerinin lüminal membranları boyunca önce içeri doğru ve sonra ablüminal membranı üzerinden taşınır. Bu nedenle, iyonik ödem esas olarak iki basamaklı bir transport sürecidir. Birçok beyin endotelial kanalları ve transporterleri, bu membran yüzeylerinde polarize bir dağılım gösterdiği için, iyonların ve suyun alındığı transmembran yollar, lüminal ve ablüminal membran arasında farklılık gösterir (Stokum vd., 2016).

İyonik ödem, kısmen iyonların ve suyun beyin endotelial hücreleri tarafından alınmasını açısından sitotoksik ödem ile benzerdir, ancak iyon ve su akışlarının polarize olması bakımından farklılık gösterir. Beyin endotelial hücrelerinin lümenal membranındaki kanallar, vasküler iyonların ve suyun hücrelere alınışını yönlendirir ve bu durum endotelial hücre şişmesi ile sonuçlanabilir. Endotelial şişme, ablümenal membran üzerindeki kanallar yoluyla rahatlatılır; bu kanallar iyonların ve suyun beyin interstisyumuna çıkışına izin verir, böylece transkapiller akış tamamlanır (Stokum vd., 2016).

Vazojenik ödem, KBB'nin yıkımı ile karakterize edilen bir hücre dışı ödem şeklidir. Transendotelial bir permeabilite poru, interstisyel kompartmana albumin ve IgG gibi plazma proteinlerinin ve suyun ekstravazasyonuna izin verir. Hemorajiden farklı olarak, kapiller yapısal bütünlük vazojenik ödem sırasında muhafaza edilir; böylece eritrositlerin geçişi önlenir. Bu nedenle vazojenik ödem hücre dışı kan ultrafiltratıdır, yani plazmadır (Stokum vd., 2016).

Vasküler ve interstisyel kompartmanlar arasında fiziksel iletişim sağlandıktan sonra, mikrodamarlar fenestralı kapiller gibi davranır; bu nedenle hidrostatik basınç vazojenik ödem oluşumu için primer itici gücü oluştursa da, hem hidrostatik hem de ozmotik basınç gradientleri ödem oluşumunu etkileyebilir. İKB, sistemik kan basıncı, kapiller oklüzyon ve vazospazm gibi hidrostatik basınç gradientinin belirleyicileri, vazojenik ödem dinamikleri için önemli görülmektedir (Stokum vd., 2016).

İyonik ödem ve vazojenik ödem, önemli düzeyde farklılaşan hücre dışı ödem formlarıdır. Vazojenik ödem damar dışına çıkan serum proteinleri içerir, ancak iyonik ödem içermez (Stokum vd., 2016). Vazojenik ödem, sitotoksik ödemi izleyerek, özellikle reperfüzyon hasarına bağlı olarak salınan sitokinler ve serbest radikaller gibi etkenlerle, damar duvarındaki endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantıların çözülerek, KBB bütünlüğünün bozulması sonucu gelişir. Bu durumda damar içi hidrostatik basınç, plazma türevlerini hücreler arası boşluğa geçirir ve suyu da beraberinde sürükler. Bu durum özellikle beyaz cevherde görülür ve bölgesel su içeriği artar. Bununla birlikte, bölgesel doku kompliyansı da yükselerek, makromoleküllere kapiller permeabilite artar ve ekstraselüler boşluk genişler. Doku sitotoksik ödemde sertken, vazojenik ödemde yumuşaktır. Vazojenik ödem, steroidlere yanıt verebilen tek serebral ödem türüdür (Wykes & Vindlacheruvu, 2015).

Hemorajik konversiyon veya hemorajik transformasyon olarak da adlandırılan *İntraserebral Hemoraji*, eritrositler ve diğer hücreler de dahil olmak üzere kanın tüm bileşenlerinin ekstravazasyonuna olanak sağlayan, kapillerin yapısal bütünlüğünün kaybedildiği bir durumdur. İskemik inme hastalarının yaklaşık % 30-40 kadarı hemoraji geçirmektedir. Vazojenik ödemde olduğu gibi, hidrostatik basınç, hemorajik transformasyonun başlıca

itici gücüdür. Ancak ekstre vaze olan kan, lokal doku hidrostatik basıncını arttırır ve bu nedenle daha fazla hemorajiye neden olmaz. Bu durumun neden olduğu kitle etkisi, doku distorsiyonu ve aynı zamanda methemoglobin gibi kan ürünleri tarafından tetiklenen güçlü inflamatuvar cevap, daha ağır basmaktadır (Stokum vd., 2016).

Fokal MSS hasarının bir şekli olan hemoraji, kendiliğinden hemorajiyi hızlıca çevreleyen doku kabuğunda (perihematomal boşluk) *Perihematomal Ödem* olarak adlandırılan bir serebral ödem oluşumunu tetikler. Bu ödem türünün iyonik ödem, vazojenik ödem ve gecikmiş vazojenik ödem olmak üzere 3 aşamada gerçekleştiği belirtilmektedir (Urday vd., 2015).

Perihematomal ödemin ilk basamağı olan *Perihematomal İyonik Ödem*, iki süreç tarafından oluşturulan transendotelial ozmotik kuvvetler tarafından yönlendirilir. Birincisi, sitotoksik ödem, glutamat bu bölgede birikmeye eğilimli olduğu için, perihematomal boşluğunda oluşur ve iyonik ödemin içeri yönde akışı için itici bir güç oluşturur. İkincisi, hematomdaki pıhtılaşma kaskadının aktivasyonunun, serum proteinlerinin eksüda oluşturması ve perihematomal boşluğun artan koloidal basıncıyla sonuçlandığı yerde pıhtının geri çekilmesi, suyun içeri doğru akışını yönlendirir (Stokum vd., 2016).

Perihematomal ödemin ikinci evresi olan *Perihematomal Vazojenik Ödem*, kan ürünlerinin ve eritrositlerin ekstre vazyonu olmaksızın, serum proteinlerinin ekstre vazyonu olarak görülen, beyin endotelindeki değişiklikler tetiklendiğinde ortaya çıkar. Hemorajik kanla ekstre vaze edilen ve hasar yerinde üretilen bir protein olan trombin, bu ödem türünün oluşumuna büyük katkıda bulunur. Trombin, bazı reseptörler aracılığıyla mikrogliaları aktive ederek, endotel hücrelerinde sıkı bağlantı proteinlerinin down-regülasyonuna ve KBB'nin açılmasını sağlayan TNF ve IL-1β'nin salgılanmasına neden olur (Stokum vd., 2016). Ayrıca trombin, endotelial retraksiyon ve kemokinler ile adezyon moleküllerinin endotelial up-regülasyonunu tetikleyerek, dolaşımdaki lökositlerin transmigrasyonuna olanak sağlar. İnfiltratör olan lökositler, reaktif oksijen türleri gibi moleküllerin salgılanması yoluyla, perihematomal ödeme katkıda bulunur. Trombine ilaveten, kompleman kaskadı perihematomal vazojenik ödemin önemli bir mediyatörüdür. Kompleman kaskadının aktivasyonu, anafilatoksinlerin üretimi, membran atak kompleksi (MAC) aracılı kırmızı kan hücrelerinin parçalanması, demir-indüklü ödem ve nötrofillerin infiltrasyonu ile sonuçlanır (Stokum vd., 2016).

Perihematomal ödemin üçüncü ve son aşaması olan *Gecikmiş Vazojenik Ödem*, ekstre vaze olan ve parçalanmış eritrositlerden kaynaklanan, demir gibi hemoglobin degradasyon ürünleri aracılığıyla oluşur (Urday vd., 2015). İnterstisyumda, hemoglobin methemoglobine hızla okside edilir; hem grubu

spontan olarak salınabilir ve hem oksijenaz enzimleri tarafından serbest demire degrade edilebilir. Bir hemoraji olayından yaklaşık 3 gün sonra serbest demir, dokuda maksimum düzeye ulaştığından, eritrosit lizisi ve hemoglobin degradasyonu görünüşte nispeten yavaş bir işlemdir. Çoğu hemoglobin degradasyon ürünü, perihematomal gecikmiş vazojenik ödem üzerine bağımsız olarak katkıda bulunur. Demir şelasyonu, intraserebral hemoraji modellerinde içeri yönde ödem akışını azaltırken; serbest demir ROS üretimi, MMP-9 aktivasyonu ve KBB yıkımını tetikler. Hücre dışı methemoglobin ayrıca mikroglial TNF salgılanmasını ve nöroinflamasyonu tetikleyebilen bir etki gösterir (Urday vd., 2015).

İskemik Ödem, başlıca hücre membranına enerji sağlayan Na^+/K^+ -ATPaz pompasının disfonksiyonu sonucu oluşur. Bu durum hücre içinde Na^+ ve su, hücre dışında ise K^+ artışına neden olur. Kapiller endotel hücreleri iskemiyeye karşı dirençlidir ve KBB başlangıçta sağlamdır. Sonrasında damar yatağından hücreler arası sıvıya Na^+ geçişi devam eder. Bu arada glial hücre zarında iyon alışverişi durmuştur. Bu durum hücrelerarası boşlukta giderek Na^+ birikimine neden olur. Sonuçta hücre içi sıvı artışına ilaveten, hücreler arası boşlukta da su birikimi tabloya eklenir. Dolayısıyla, iskemik ödem, sitotoksik ve vazojenik ödemle ilişkilidir (Klatzo, 1987).

İskemik ödem başlıca serebral korteksi etkiler. Biriken ödemin miktarı, kan akımındaki azalmanın derecesine bağlıdır. Akım 20 mL/100 g/dakika'dan daha az olduğunda ödem oluştuğu ve ödemin akım azaldıkça arttığı belirtilmektedir. Bir saatlik iskemiden sonra akımın 10 mL/100g/dakika'dan daha az miktarlarda azaldığı alanlarda ödemin kaybolduğu ancak daha ileri derecede iskemiyeye uğramış (7mL/100g/dakika) alanlarda hızlandığı yönünde bilgiler mevcuttur (Köksel ve Gülerüz, 2001).

Beyin hacmi su içeriği açısından geometrik bir fonksiyon gösterdiği için, beyin su içeriği yüzdesindeki çok küçük değişimler, hacimde oldukça büyük değişiklikler oluşturarak, olumlu yönde etkiler gösterebilir (Bhardwaj, 2007). Nöronal hasarı olmayan/olan (KBB bozulmamış/bozulmuş) sıçanlarda hipertonic solüsyonlarla yapılan deneysel çalışmalarda, 350 mOsm/L'nin üzerindeki serum ozmolalitesinin, mortalite veya sonlanım üzerinde olumsuz bir etki göstermeksizin, beyin ve ekstraserebral organlarda su içeriğini iyileştirdiği gösterilmiştir (Toung, Chen, Lin, & Bhardwaj, 2007).

KBB bütünlüğünün bozulması ve mikrovasküler hasar sonrasında meydana gelen kan bileşenlerinin sızıntısı, beyin hacmini doğrudan artırır ve aynı zamanda albümin kolloidal ozmotik etkisi nedeniyle, beyne daha fazla su çektirir. Bu nedenle, iskemik hasarlar KBB'nin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünü birçok yolla bozabilir; beyin hacmini ve İKB'yi ani bir şekilde artırabilir. Beyin şişmesi, hücre içi ve hücre dışı ödem bakımından ayrı ayrı

analiz edilebilmesine rağmen, asıl beyin ödemi oluşumu, yoğun hücre içi ve hücre dışı iyon ve su alış-verişi olan kesintisiz bir süreçtir (Jia vd., 2016). Ödemin erken klinik kötüleşmenin ve ölümün ana nedeni olduğu ve tüm serebral infarktlerin yaklaşık %30 kadarının fatal sonlandığı düşünüldüğünde, akut evrede gelişen ödemin önlenmesi ya da hızla tedavi edilebilmesi, iyi bir klinik sonlanım açısından büyük bir önem taşımaktadır.

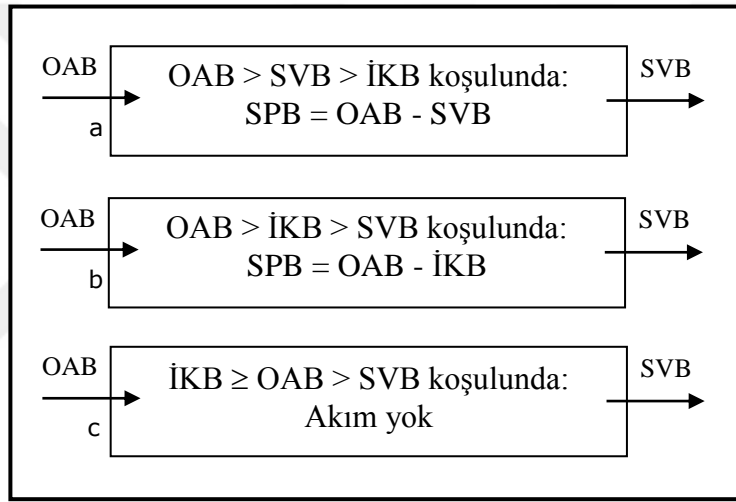
2.5.1. İntrakraniyal Basınç (İKB) ve Ödem

Mekanik ve sıvı dinamiği açısından, beyin dokusu diğer dokulardan farklıdır. Beyin parenkimi, ekstraselüler sıvı, BOS ve intravasküler kan normalde 15 mmHg'dan daha az bir İKB meydana getirir. Monro-Kellie doktrinine göre, bu intrakraniyal bileşenlerin (beyin, kan, BOS) hacimleri toplamının sabit olduğu kabul edilir (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Beyin tümörü, spontan hematoma veya travmatik beyin hasarında olduğu gibi, kompartimental hacimdeki herhangi bir artış, diğer bileşenlerin hacminde bir azalma ile telafi edilmelidir. Ayrıca beyindeki boşluklar ve subaraknoid aralık BOS ile doludur. Subaraknoid aralık, büyük ve orta çaplı arter ve venlerin etrafındaki pia mater içinde, beyin dokusunun derinliklerine kadar ilerlediği için, İKB ve BOS basıncı artışı doğrudan beyin dokusuna yansır. Kafatası esnekliğinin yetişkin bir insanda sifira yakın olması nedeniyle, İKB ve BOS basıncı artışına yol açan her olayda, beyin dokusu ve İSS basıncı doğru orantılı olarak yükselir ve doku perfüzyonu önemli ölçüde bozulur (Kumral, 2001; Köksel & Gülerüz, 2001; Kutluk, 2004) (Şekil 2.10).

Bütün vücut dokuları arasında beyin, iskemiye en az toleransı olanıdır ve sabit bir serebral kan akımına ihtiyaç duyar. Serebral kan akımındaki 5 saniye süren bir kesinti dahi bilinç kaybına yol açabilir; 3 dakikadan daha uzun süreli bir iskemi ise geri döndürülemeyen beyin hasarı ile sonuçlanabilir (Wykes & Vindlacheruvu, 2015; Berne, Levy, Koeppen, Staton, 2008, s.426). Ancak diğer dokulardan farklı olarak, beyindeki dolaşım esas olarak beyinin kendi kontrolü altındadır (Berne vd., 2008, s.426).

Otoregülatör kompensatuar mekanizmalar, İKB'nin normal sınırlar içinde kalmasını sağlamak üzere, BOS'un spinal intradural boşluğa doğru yer değiştirmesi ve serebral venler ve venöz sinüslerin sistemik venöz dolaşıma drenajının artmasına neden olan vasküler dirençteki değişiklikler, gibi yollarla hacim artışlarını tamponlayabilir (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Ancak bu mekanizmalar yetersiz kalırsa, dekompensasyon sonucu İKB yükselir. İKB yükseldiğinde, sekonder beyin hasarı ve daha fazla şişme şeklinde bir kısır döngü meydana gelir. İKB, arteriyel basınca eşit olursa arteriyel kan beyin içerisine girmez ve kitlesel infarktüs meydana gelir. Şişme ile ilişkili lokalize bir kitle, beyin kayması ve herniasyona dahi neden olabilmektedir (Wykes & Vindlacheruvu, 2015).

Serebral otoregölasyon vasküler direnci değiştirerek geniş bir serebral perfüzyon basıncı üzerinden, yaklaşık 50 mL/dk/100g beyin şeklinde bir akım hızına sahiptir. Arteriyel kan basıncı 50 ila 140 mm Hg arasında olduğunda, beyin dolaşımı mükemmel bir otoregölasyon gösterir. Normal fizyolojik koşullar altında, ortalama arteriyel kan basıncı 60 mm Hg'nin altına indiğinde *Oksijen Ekstraksiyon Fraksiyonu* (OEF) artırılarak normal metabolizma devam ettirmeye çalışılır. Ancak sistemik hipoksida ya da kan basıncının ileri derecede düşmesi durumunda, OEF artışına rağmen bazal metabolizmanın gereksinimi karşılanamaz ve beyin infaktı gelişir (Kutluk, 2004). Bunun yanı sıra, ortalama 140 mm Hg üzerindeki basınçlar ise KBB'de geçirgenlik artışına neden olarak ödem oluşumu ile sonuçlanabilir (Berne vd., 2008, s.426).



Şekil 2.10. Serebral Kan Akımında Basınç-Hacim İlişkisi. a) Normal durumda serebral perfüzyon basıncı (SPB), ortalama arter basıncından (OAB) venöz basıncın (SVB) çıkarılmasıyla hesaplanır. b) İntrakraniyal basıncın (İKB) arttığı durumda (serebral venöz basıncı aşarsa) serebral perfüzyon basıncı, ortalama arter basıncından intrakraniyal basıncın çıkarılmasıyla bulunur. c) İntrakraniyal basınç ortalama arter basıncına eşit ya da daha yüksekse, serebral perfüzyon durur (Kutluk, 2004).

İKB artışına neden olabilen beyin ödemi, akut beyin hasarı ve inme hastalarında en yıkıcı komplikasyonlardan biridir (Lin vd., 2015); acil tanı ve tedavi gerektirir. İnmenin başlangıcında beyin ödemi, KBB yıkımı, azalan serebral kan akımı ile bağlantılı İKB artışı gibi patofizyolojik yanıtlar, iskemik beyin hasarını daha da ilerletir (Zeynalov, Jones, Seo, Snell & Elliott, 2015). Bu nedenle makro- ve mikro-sirkülasyondaki değişimlerin normal fizyolojik koşullar altında tutulabilmesi amacıyla, yüksek kafa içi basıncını kontrol altına alabilmek; dokunun daha ileri düzey hasarlardan ve komplikasyonlardan korunabilmesinde, iyileşme potansiyeli olan hücreler için en uygun biyolojik koşulların sağlanabilmesinde, özellikle tedavi süresi ve klinik sonuçları açısından hayat kurtarıcı nitelikte büyük önem taşımaktadır.

2.5.2. Ödem Tedavisi

2.5.2.1. Mannitol

Ozmoterapi, akut beyin hasarı olan çocuk ve yetişkinlerde, etiyojiden bağımsız olarak, yüksek İKB'nin tedavisi amacıyla yıllardır kullanılmaktadır. Ancak ozmoterapinin sonlanım üzerindeki etkilerini analiz eden yeterli düzeyde güvenilir sistematik bilimsel çalışmaların bulunmaması ve yapılan meta-analizlerde beyin ödeminde ağır sonlanım riski taşıdığı gerekçesiyle, son yıllarda rutin kullanımına şüpheyle yaklaşılmaktadır. Buna rağmen, örneğin mannitol uygulamasının, yetişkinlerde ve çocuklarda travma sonrası beyin ödeminde, intrakraniyal hipertansiyonun rutin tedavisi için mevcut tüm kılavuzlara dahil edilmiştir (Grande & Romner, 2012).

1961 yılında piyasaya sürülen, mannoz şekerinin bir alkol türevidir olan Mannitol, beyin ödemi ve yüksek İKB tedavisinde en fazla tercih edilen ozmotik diüretik bir ajandır (Grande & Romner, 2012); yüksek İKB yönetiminde *Mannitol* uygulamasını altın standart olarak kabul gördüğü belirtilmektedir (Marko, 2012). Kan akışkanlığını düşürerek ve eritrositlerin elastikiyetini artırarak, kan reolojisini iyileştirmek üzere hızlı bir etki gösteren plazma genişleticisi (plasma expander) olarak da tanımlanmaktadır (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Molekül ağırlığı 182 Da olan nispeten küçük bir moleküldür; metabolize edilmez, böbrek tübüllerinde reabsorbe edilmez ve idrarla değişmeden atılır (Grande & Romner, 2012).

Her bir mannitol molekülü beraberinde 5 su molekülünün atılmasını sağlar (Castillo, Bugedo & Paranhos, 2009). İKB'yi düşürücü etkisinin başlaması 1-5 dakika arasındadır. Ozmotik etkisi 30 dakikaya kadar başlar ve 1,5-6 saat kadar devam eder (Wykes & Vindlacheruvu, 2015). Önerilen bolus dozu ise 0,25-1g/kg vücut ağırlığı düzeylerindedir.

Ozmotik ajanların gücü için Refleksiyon Katsayısı (σ) kavramı dikkate alınmaktadır. Bir maddenin refleksiyon katsayısı, molekülün mikrovasküler duvar boyunca pasif olarak geçme zorluğunu yansıtır; $\sigma=0$, molekülün serbestçe permeabl ve $\sigma=1$ ise impermeabl olduğu anlamına gelir (Grande & Romner, 2012). Sağlıklı beyinde mannitol için $\sigma=0.9$, hasarlı beyinde ise daha az olduğundan, mannitol hem sağlam hem de bozulmuş KBB'den geçebilir. Hipertonik mannitole maruz bırakılan astroglial hücrelerle yapılan bir in vitro çalışmada, 5 dakika içinde intraselüler ve ekstraselüler mannitol konsantrasyonlarının aynı olduğu gösterilmiştir (McManus & Soriano, 1998). Bu sonuç, mannitolün hücre membranlarından kolaylıkla nüfuz edebildiğini göstermektedir.

Mannitolün kesin etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte, özellikle ozmotik ve hemodinamik olmak üzere, başlıca iki ana mekanizma üzerinde durulmaktadır (Rabinstein, 2006). Ozmotik etkisi ile, kılcal damarlar ve hücre membranları boyunca ozmotik gradientlerden sıvı transferini indükleyerek, doku hacmini azalttığı düşünülmektedir. Bu durum interstisyumda plazmadan daha yüksek ozmolalite olduğu sürece, interstisyel boşluktan intravasküler boşluğa; ekstraselüler ozmolalite intraselüler ozmolaliteden daha yüksek olduğunda ise, intraselüler boşluktan ekstraselüler boşluğa sıvı transferi gerçekleşeceği anlamına gelir (Grande & Romner, 2012). Böylece, mannitol intravasküler tonüsü artırarak, KBB boyunca ödemli beyin dokusundan intravasküler boşluğa suyun hareketini zorlayan bir konsantrasyon gradiyenti oluşturur; bunu mannitol ve suyun hızlı bir renal atılımı izler (Rabinstein, 2006). Mannitolün hemodinamik etkilerine ise, serebral kan akışında artışa ve bunu takiben gerçekleşen pasif vazokonstriksiyon nedeniyle kan hacminde düşüşe yol açan, kan viskozitesindeki azalmanın aracılık ettiği ileri sürülmektedir. Reolojik değişiklikler kan dilüsyonu ve eritrositlerin artan deformabilitesinden kaynaklanmaktadır. Oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşen bu değişikliklerin, beyin su içeriğindeki azalma öncesinde görülen İKB'deki erken düşüşten sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Rabinstein, 2006).

Ozmoterapinin, vasküler endotelial hücreler ve eritrositlerde de, sıvı transferini indüklediğini, aynı zamanda doku hacmini azaltıcı ve plazma hacmini arttırıcı etkiye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Grande & Romner, 2012). Özellikle endotelial hücrelerin büzülmesi, toplam hacimlerinin oldukça büyük olması nedeniyle, hem sağlıklı hem de hasarlı beyinde hacim azalmasına geçici olarak katkı sağlayabilir. Eritrositlerin büzülmesi ise, intravasküler beyin hacmini düşürür, eritrositlerin rijiditesini ve yapışkanlığını azaltır. Düşük hematokrit düzeyi eşliğinde, bu durumun kan reolojisini değiştirebileceği, kan akışkanlığında azalma ve mikrosirkülasyonda iyileşme sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Grande & Romner, 2012).

Mannitolün ileri sürülen diğer mekanizmaları serbest radikal temizleme, apoptozun inhibisyonu, immun modülasyon, otheregülatör vazokonstriksiyon ve neticede serebral kan hacminde azalmaya yol açabilen serebral perfüzyon basıncının artırılmasıdır (Rabinstein, 2006).

Standardize mannitol dozaj rejimi 1-1,5 g/kg bolus içinde % 20'lik mannitol ve ardından 4-6 saatte 0,25-0,5 g/kg uygulanması şeklindedir (Rabinstein, 2006). Ancak mannitolün, İKB'de "rebound" yükselmelerine yol açarak zarar gören beyin dokusuna muhtemel sızıntı olasılığı da kaygı verici olarak görülmektedir (Rabinstein, 2006). Rebound fenomeni, ozmotik bir ajanın infüzyonu kesildikten sonra ödemdeki artış anlamına gelir ve bu da tedavi öncesindeki seviyesine doğru veya daha yüksek bir İKB'ye neden olur. Rebound fenomeni, infüzyon kesildikten sonra kan ile interstisyel ve

intraselüler boşluklar arasındaki ozmotik gradiyentin tersine çevrilmesiyle, ajanın beyinde interstisyel ve intraselüler birikimi şeklinde açıklanmıştır. Bu nedenle, rebound etkisi özellikle KBB bozulan bir beyinde ortaya çıkabilir (Grande & Romner, 2012).

Bir ozmotik ajanın ilk dozu en etkili olanıdır; sonraki dozların etkisi ard arda etkisiz hale gelene kadar daha da azalacaktır. Bu durumun, maksimumuna ulaşan çeşitli hücrelerin büzülmesiyle, ozmotik ajanın kapiller ve hücrel membranlar boyunca ard arda azalan bir konsantrasyon farkı üzerinden açıklanabileceği düşünülmektedir (Grande & Romner, 2012). Bu nedenle, bu ozmoterapi her başlatıldığında, daha sonraki rebound artışına ve sonuçta kontrolsüz derecede yüksek bir İKB'ye neden olabilecek benzeri durumları geciktirmek için, bir diğerinin devam etmesi gerekli görülmektedir. Ancak literatürde çoklu mannitol dozlarının ödematöz bölgelerde su içeriğinde daha da artışa neden olduğuna dair veriler de bulunmaktadır.

KBB'nin bozulduğu veya uzun süreli mannitol infüzyonunun içeri daha fazla sıvı çekerek, beyin parenkiminde mannitol birikimine yol açabildiği durumlarda oluşan intrakraniyal hipertansiyon reboundu; bunun yanı sıra asidoz, elektrolit dengesizliği, nöbetler, akut kalp yetmezliği, akut böbrek hasarı, pulmoner ödem, hipotansiyon, hiponatremi, hipovolemi (Rabinstein, 2006), letarji, konfüzyon, baş dönmesi, bulantı, kusma, polidipsi gibi yan etkileri olması nedeniyle (Dökmeci ve Dökmeci, 2007) hastalarda nörolojik durum, elektrolitler, serum ozmolaritesi, idrar ozmolaritesi ve sıvı dengesinin izlenmesi önemli görülmektedir; serum ozmolalitesinin 320 mOsm/kg üzerine çıkmasına izin verilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır (Rabinstein, 2006).

Literatürde, risklerinin daha az olması sebebiyle, mannitol yerine hipertonic salin, dekstran, albumin, sodyum bazlı hipertonic solüsyonlar ve gliserin uygulamalarının etkinliğini araştıran çeşitli çalışmalar yer almaktadır (Bentsen, Breivik, Lundar & Stubhaug, 2006; Forsyth, Liu-DeRyke & Rhoney, 2008; Kamel, Navi, Nakagawa, Hemphill & Ko, 2011).

Yan etkileri nedeniyle, mannitol lehine olan araştırmaların yanıltıcı olduğu görüşü yaygındır ve özellikle son yıllarda yapılan meta-analizlerde bu tür ozmoterapilerin rutin kullanımına destek verilmemektedir. Ancak alan-ışgal eden lezyonların boşaltılması veya dekompresif kraniyotomi gibi diğer önlemler uygulanıncaya kadar, beyin sapı kompresyonunu akut bir şekilde engellemek için, ozmoterapinin geçici bir önlem olarak kullanılmasına olumlu yaklaşılmaktadır (Grande & Romner, 2012).

2.5.2.2. Antidiüretik Hormon Antagonistleri

2.5.2.2.1. Antidiüretik Hormon ve Etki Mekanizması

Arjinin vazopressin olarak da adlandırılan, 9 amino asitlik küçük bir nöropeptid olan *Antidiüretik hormon* (ADH), hipotalamusta sentezlenerek posteriyör hipofizde depolanmaktadır. Vücutta yüksek plazma ozmotik basıncı ve hipovolemi gibi uyaranlara yanıt olarak salınmaktadır. ADH serbest suyun reabsorpsiyonu, vücut sıvı ozmolalitesi, kan hacmi, kan basıncı, hücre kontraksiyonu ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde; adrenokortikotropik hormon (ACTH) sekresyonunda aktif olarak rol oynamaktadır (Thibonnier, Coles, Thibonnier & Shoham, 2001). Bu hormonun en önemli fonksiyonu, böbrekteki reseptörleriyle etkileşerek su homeostazını korumaktır (Greenberg & Verbalis, 2006). Reseptörleri, beyin ve omurilik boyunca yaygın şekilde dağılmıştır; nöronlarda, astrositlerde ve bunların perivasküler çıkıntılarında, kan damarlarının endotelial ve düz kas hücrelerinde ve koroid pleksusta bulunmaktadır. ADH'nin bu histolojik özellikleri, hücre membranlarındaki hidromineral dengeyi ve KBB'nin geçirgenliğini modüle etdebilmesine olanak sağlamaktadır (Jia, 2016).

Antidiüretik hormon üç hipotalamik nukleusta sentezlenmektedir: Bunlar *Supraoptik Nukleus*, *Paraventriküler Nukleus* ve *Suprakiazmatik Nukleus*'tur. Supraoptik nukleustaki nöronlar ve paraventriküler nukleustaki magnoselüler nöronlar, hipertonsite ve volüm azalmasına yanıtla ilişkilidir. Paraventriküler nukleustaki parvoselüler nöronlar, hipotalamik salgılatıcı faktörleri salgılar, belirli durumlarda ADH da salgılar, aksonal uzantılarını hipotalmik-hipofizyal portal sistem yoluyla adenohipofize taşınan sekrete peptidlerin bulunduğu yer olan *Medyan Eminans*'a gönderir (Palmer, 2015). Suprakiazmatik nukleustaki nöronlar ise, aksonlarını üçüncü bir ventriküle gönderir ve ADH'ın BOS'a sekresyonundan sorumludur.

ADH sekresyonu, plazma ozmolalitesindeki artış ve kan basıncındaki azalma gibi uyaranlara yanıt olarak, ADH içeren sekretuar granüllerin egzozitozu ile sağlanmaktadır (Yakaryılmaz & Özden, 2009). Hormon karaciğer ve böbrekte hızlıca metabolize olur; dolaşımdaki yarılanma ömrü yaklaşık 15-20 dakika kadardır (Costello-Boerrigter & Boerrigter, 2009). İnsanlarda ADH salınımı için eşik osmotik değer yaklaşık 280-290 mOsm/kg (mmol/kg)'dır. Sıçanlarda plazma ozmolalitesindeki her %1'lik artış ile birlikte ADH düzeyinin de 2-4 kat arttığı bildirilmiştir (Dunn, Brennan, Nelson & Robertson, 1973).

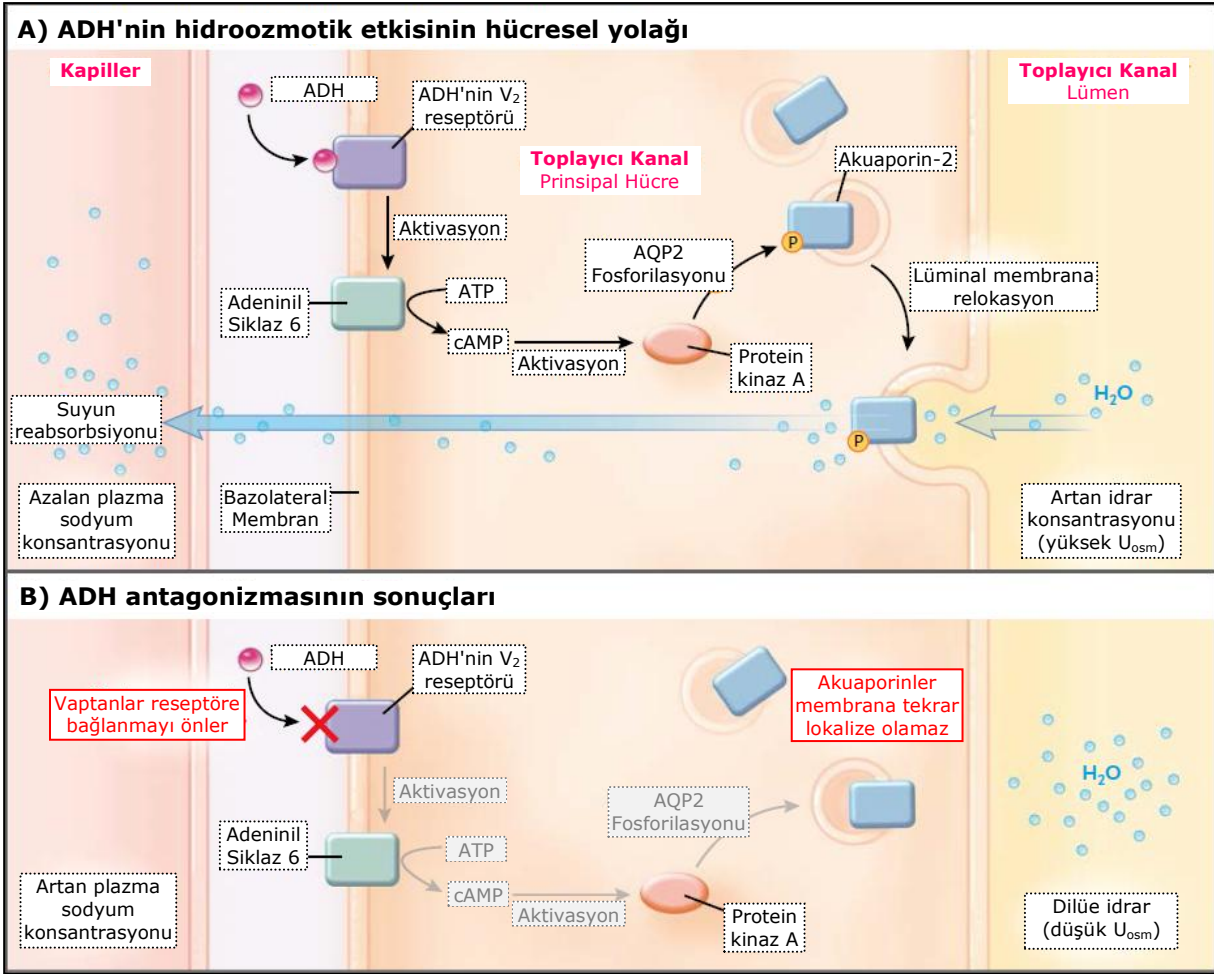
Antidiüretik hormon etkilerini G-protein ilişkili V_{1A} (vasküler), V_2 (renal) ve V_{1B} (hipofizer, V_3) olmak üzere üç alt tip membran reseptörü üzerinden gösterir; bu reseptörlerin lokalizasyonlarında, sinyal ileti sistemlerinde ve

etkilerinde farklılıklar bulunmaktadır (Aditya & Rattan, 2012; Kantarcı & Demiran, 2011; Yakaryılmaz & Özden, 2009; Decaux, Soupart & Vassart, 2008).

V_{1A} reseptörleri MSS, karaciğer, böbrek, reproduktif organlar, dalak, adrenal korteks, adipositler, trombositler ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. V_{1A} reseptörü beyinde en çok bulunan ADH reseptörü olarak belirtilmektedir; serebral vaskülatür, serebral korteks, stria terminalisin yatak (bed) nukleusu, nucleus accumbens, amigdala'nın merkezi nukleusu, sigmoid hipotalamik nukleus, suprakiazmatik nukleus, hipokampus, koroid pleksuslar ve hipofiz bezi gibi çeşitli alanlarda ekprese edildiği belirtilmektedir (Amelie vd., 2014).

Antidiüretik hormonunun V_{1A} reseptörlerine bağlanması fosfolipaz C, D ve A_2 aktivasyonuna; inozitol 1,4,5-trifosfat ve diaçilgliserol üretimine; protein kinaz C, p42/p44 MAP kinaz, PI-3-kinaz ve kalsiyum/kalmodulin-bağımlı kinaz II'nin simultan aktivasyonuna, hücre içi kalsiyumun mobilizasyonuna, ekstraselüler kalsiyumun reseptör bağımlı Ca^{++} kanalları yoluyla hücre içine akışına ve Na^+/H^+ -antiporter aktivasyonuna yol açmaktadır. V_{1A} reseptörü aktivasyonunun vasküler düz kas hücreleri, renal mezengiyal hücreler, hepatositler ve adrenal glomeruloza hücrelerinde mitojenik yanıtlara yol açtığı belirtilmektedir (Thibonnier vd., 2001; Palmer, 2015). V_{1A} reseptör aktivasyonu yoluyla tetiklenen sekonder nükleer sinyal mekanizmaları; gen ekspresyonunun erken yanıtının ve hücresel hipertrofi, hücre protein içeriği artışı ve hücre proliferasyonuna yol açan protein sentezinin indüksiyonunu kapsamaktadır (Thibonnier vd., 2001).

V_2 reseptörleri primer olarak kortikal ve medüller toplayıcı kanalların bazolateral membranlarında (distal nefronun prinsipal hücrelerinde), vasküler düz kas ve vasküler endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Böbrek toplama kanallarındaki prinsipal hücrelerin bazolateral membranlarında bulunan bu reseptörlere hormonun bağlanması, adenilat siklazı aktive eder ve ATP'den siklik AMP (cAMP) oluşmasını sağlar. cAMP, protein Kinaz A'yı aktive eder; enzim akuaporin su kanallarını (AQP-2) fosforiller ve bunların lüminal membrana tekrar lokalize olmalarını indükler (Rondon-Berrios & Berl, 2016). Böylece tübüler sıvıdan suyun kana reabsorpsiyonu sağlanır ve tübüler sıvı daha konsantre hale dönüşür (idrar ozmolalitesi artar). Bir *ADH Antagonisti* varlığında bu sinyal yolağı aktif değildir; bunun sonucunda hücrelerin su permeabilitesi düşer ve su geri absorbe edilmez. Böylece dilüe idrar atılımına neden olur; idrar ozmolalitesi azalır ve kan sodyum düzeyi artar (Berl, 2015) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. ADH'nin hücresel etkileri ve antagonizm mekanizması. A) ADH'nin hidroozmotik etkisinin hücresel yolağı; B) ADH antagonizm mekanizmasının sonuçları (Berl, 2015).

V_2 reseptörlerine bağlanarak etki gösteren ADH antagonistleri, bu mekanizma sonucu idrar çıkışında artışa neden olacak şekilde su reabsorpsiyonuna engel olmaları; üriner elektrolit atılımında bir değişikliğe neden olmadan serbest suyun atılımını sağlamaları ve idrar ozmolalitesini düşürmeleri sebebiyle *Akuaretik* olarak da adlandırılırlar. Serbest suyun atılım derecesine ve sıvı alımına bağlı olarak, plazma sodyum ve plazma ozmolalitesi artabilmektedir (Costello-Boerrigter vd., 2009) (Tablo 2.4). Bu mekanizmanın, hipofizden hızlı sekresyonu ve yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle ADH'nin, neden böbrek su atılımının en belirgin regülatörü ve serum ozmolalitesi ile iyon homeostazının önemli bir belirleyicisi olduğu görüşüne açıklık getirdiği ileri sürülmektedir (Amelie vd., 2014).

Tablo 2.4. Akuaretik ve diüretiklerin farkları (Narayan & Mandal, 2012; Verbalis vd., 2007)

| Etkiler | Akuaretikler | Diüretikler |
|--|----------------|-------------|
| Serbest su atılımı | Daha fazla | Az |
| Serum potasyum düzeyi | Değişiklik yok | Düşürür |
| Serum ozmolalitesi | Değişiklik yok | Düşürür |
| Kan akış hızı | Değişiklik yok | Düşürür |
| Glomerüler filtrasyon hızı | Değişiklik yok | Düşürür |
| Orostatik hipotansiyonu başlatma | Hayır | Evet |
| Norepinefrin ve plazma renin aktivasyonu | Hayır | Evet |
| BUN ve serum kreatinin artışı | Hayır | Evet |

V_{1B} (veya V_3) reseptörleri ise en çok anterior hipofiz kortikotrop hücrelerinde ve daha az olarak da beyin, böbrek, pankreas ve adrenal medullada bulunmaktadır (Yakaryılmaz & Özden, 2009; Costello-Boerrigter vd., 2009; Jagadeesh, Muthiah & Muniappan, 2014; Thibonnier vd., 2001; Narayan & Mandal, 2012). Yapılan çalışmalarda V_{1B} reseptörlerinin aktivasyonunun fosfolipaz C ve protein kinaz C aktivasyonunu, hücre içi serbest kalsiyum mobilizasyonunu, miristoil-bağlı alanince zengin C kinaz substratının fosforilasyonunu ve ACTH sekresyonunu tetiklediği bildirilmiştir. V_{1B} reseptörleri, fosfolipaz C ve adenilat siklaza bağlanma çalışmalarında, hipofiz reseptörü için özgün bir farmakolojik profil göstermesi nedeniyle V_{1A} ve V_2 alt tiplerinden ayrı olarak sınıflandırılmıştır (Thibonnier vd., 2001).

İskemiyi kapsayan herhangi bir etyolojide beyin hasarı, ADH ve kortikotropin salgılatıcı hormon gibi stres hormonlarının salınmasına neden olur ve her ikisi daha sonra kortizolün salınması yoluyla strese yanıtı başlatır (Chang vd., 2006; Stevens vd., 2003). Akut beyin hasarında ADH'in rolünün güçlü bir kanıtı olarak, serebral iske mi ve reperfüzyon sonrası hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler nukleuslarında ADH gen ekspresyonunun up-regüle olduğu belirtilmiştir (Amelie vd., 2014; Liu vd., 2000).

İskemik inmenin ortaya çıkmasını takiben, ADH seviyesi plazmada, BOS'ta ve çeşitli beyin bölgelerinde artış göstermektedir (Jia, 2016). İnme sonrasında yükselen ADH düzeylerinin, hem kılcal damarlarda hem de glial hücrelerdeki su geçirgenliğinin gelişmesinden (Chang vd., 2006), BOS üretiminin regülasyonu ve serebral iyon homeostazından sorumlu olduğu belirtilmektedir (Amelie vd., 2014).

ADH yüksekliğinin düzeyi, hastalarda beyin hasarının ciddiyeti ile pozitif yönde ilişkilidir. Hayvan çalışmalarında da, örneğin orta serebral arter veya bilateral ana karotid ligasyonu olan sıçanlarda, ADH seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Mongolian gerbillerde, unilateral karotid arterin oklüzyonu,

korteks ödemeine neden olduğu ve ilk 6 saatte iskemik alanda ADH düzeylerini artırdığı, ödem düzeyinin lokal ADH düzeyleri arasında pek çok negatif ilişki olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2015b). Sıçanlarda, travmatik beyin hasarından 1-2 saat sonra oluşan hasarlı parenkimdeki serebrovasküler endotelde, nöronlarda ve astrositlerde V_{1A} reseptörlerinin ekspresyonu anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir (Szmydynger-Chodobska vd., 2004). Artan V_{1A} reseptör ekspresyonunun, AQP4 ekspresyonu ile yüksek korelasyona sahip olduğu; reseptör ekspresyonunun AQP4 ile ilişkisinin, ADH'nin beyin ödemi ile ilerletmesine temel oluşturduğu belirtilmektedir (Jia, 2016). Dolayısıyla ADH'nin, hücre membranları ve KBB üzerinden hidromineral dengeyi değiştirerek, beyin ödemi oluşumuna neden olabileceği düşünölmektedir. Böylece, ADH hipersekresyonunun merkezi ve periferel reseptörleri aktive ederek, beyin ödemi kolaylaştırmak için intraselöler ve ekstraselöler hidromineral tutulumunu artırabileceği düşünölmektedir (Jia, 2016).

ADH'nin hidromineral denge üzerine doğrudan etkisi ile paralel olarak, aşırı ADH beyin ödemi çeşitli yollarla artırabilmektedir (Jia, 2016): (1) Beyin lateral ventrikölüne uygulanan ADH, V_{1A} reseptörlerinin aktivasyonu ile sempatik aktivasyonu indökler; sempatik aktivasyon, NKCC1'i aktive eden adrenerjik aktiviteyi artırabilir; (2) Sıçanlarda ADH hipertansiyonu arttırırken, arteriyel konstriksiyon ve doku hipoksisine neden olabilir; bu durum KBB'de bozulma ve kan damarlarında sızıntıya neden olabilir; (3) V_{1A} reseptörünün aktivasyonu, fare serebral kan damarlarında endotelin-1'i arttırır ve oksidatif strese ve vazomotor disfonksiyona yol açarak serebral iskemiye hassasiyeti şiddetlendirir; (4) ADH hasarlı kortekse inflamatuvar hücrelerin akışını arttırır; ve (5) domuz pial arterinde, ADH bir protein kinaz C'ye bağımlı şekilde O_2^- üretimini arttırır ve bu nedenle KBB'nin bütönlüğünü bozar.

Dolayısıyla, inme sonrası ADH hipersekresyonunun, K^+ ve glutamatın su ile birlikte ko-absorpsiyonunu arttırmak ve eksitotoksik hasarı önlemek için, AQP4 ekspresyonunu upregüle edebileceği; AQP4'ün V_{1A} reseptörü ile birlikte down-regölasyonunun, astrositlerde aşırı su yüklenmesi ve işlev bozukluğunu önleyebileceği; bu etkilerin uzun süren iskemi/reperfüzyon sırasında ADH hipersekresyonu beyin hasarını indöklese dahi, iskemik inmenin başlangıç aşamasında beyin fonksiyonlarını maksimum düzeyde korumaya yardımcı olabileceği ileri sürölmektedir (Jia, 2016).

İnme süreci kontrolsöz ADH salınımı ve beyin üzerinde zararlı etkileri olabilen hiponatremi ile daha da karmaşıklaşan bir sürece girmektedir (Zhao vd., 2015b). Antidiüretik hormon, V_{1A} ve V_2 reseptörlerini aktive ederek vazospazm, trombosit agregasyonu, su retansiyonu, dilüsyonel hiponatremi ve düşük plazma ozmolalitesine yol açmaktadır (Thibonnier vd., 2001). Bu olaylar, sodyum düzeyi düzeltilemezse, inmenin neden olduğu beyin ödemi

hızla daha da kötüleştirebilir ve mortalite oranını artırabilir (Jia vd., 2016). Bunun yanı sıra, sadece tek bir ADH reseptörünün blokajının, ADH'yi kendi reseptöründen çıkarması ve ADH sekresyonunu daha fazla uyarması olasılığı sebebiyle, plazma ADH konsantrasyonunun artabileceği; böylece bloke olmayan diğer reseptörlerin uyarımında artışın söz konusu olabileceği düşünülmektedir (Costello-Boerrigter vd., 2009). Bu nedenle iskemik beyin hasarından sonra V_{1A} ve V_2 reseptörlerinin birlikte bloke edilmesinin vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve hiponatremi gibi zararlı patofizyolojik olayları önleyebileceği düşünülmektedir (Zeynalov vd., 2015).

Antidiüretik hormon hipersekresyonunun kontrol altına alınmasına yönelik olan yaklaşımlardan biri, reseptör antagonistlerinin kullanımudur. ADH reseptörlerinin bloke edilmesi amacıyla son yıllarda çeşitli *ADH-Reseptör Antagonistleri* üretilmiştir (Tablo 2.5). 1970'lerde peptid yapıda üretilen bu ajanlar, insanlar üzerinde yapılan araştırma çalışmaları sonucunda agonist etki gösterebilmeleri, biyo-yararlanımlarının düşük olması ve parenteral uygulamada sınırlılıkları nedeniyle, sonraki yıllarda non-peptid yapıdaki formlar şeklinde üretilmeye başlanmıştır (Greenberg, & Verbalis, 2006; Peri, 2013). Bu amaçla üretilen yeni bir ilaç grubu *Vaptan*'lardır.

Tablo 2.5. ADH reseptör antagonistleri (Brunton, 2006, s.707).

| I. Peptid Yapıda ADH Antagonistleri | |
|--|--|
| V_{1A} selektif | d(CH ₂) ₅ [Tyr(Me) ²]AVP |
| V_2 selektif | des Gly-NH ₂ ⁹ -d(CH ₂) ₅ [D-Ile ² , Ile ⁴]AVP |
| | d(CH ₂) ₅ [D-Ile ² , Ile ⁴ , Ala-NH ₂ ⁹]AVP |
| V_3 selektif | dP [Tyr(Me) ²]AVP |
| II. Non-Peptid Yapıda ADH Antagonistleri | |
| V_{1A} selektif | OPC-21268 |
| | SR 49059 (Relcovaptan) |
| V_2 selektif | SR 121463A |
| | VPA-985 (Lixivaptan) |
| | OPC-31260 (Mozavaptan)* |
| | OPC-41061 (tolvaptan)* |
| V_3 selektif | SSR 149415 |
| V_{1A} ve V_2 selektif/non-selektif | YM-471 |
| | JTV-605 |
| | CL-385004 |
| | YM 087 (conivaptan)* |
| <i>AVP, Antidiüretik hormon; * Klinik amaçlı kullanılabilir</i> | |

2.5.2.2.1.1. Vaptanlar

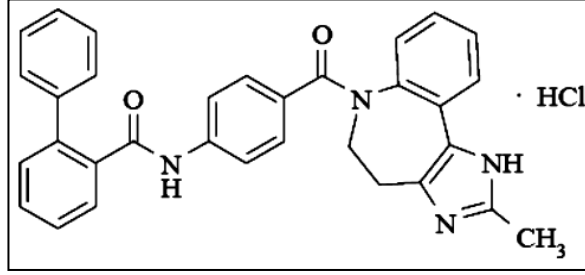
Vaptanlar, oral ve/veya intravenöz olarak aktif, non-peptid ADH reseptör antagonistleri olarak tanımlanmaktadır; bu moleküller plazmada potasyum düzeyindeki değişikliklerini minimalde tutarak, elektrolit içermeyen serbest suyun böbreklerden atılmasını indükler ve Na⁺ düzeylerini normal düzeylere getirme eğilimindedir (Krishnankutty & Rajan, 2016; Aditya & Rattan, 2012). Klinik ve deneysel çalışmalarda özellikle övolemik ve hipervolemik hiponatremi tedavisindeki etkileri araştırılmaktadır. Bu non-peptid ADH reseptör antagonistleri arasında tolvaptan, lixivaptan, satavaptan, mozavaptan ve conivaptan gibi ajanlar yer almaktadır (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. Bazı ADH V₂ reseptör antagonistlerinin özellikleri (Decaux vd., 2008).

| | OPC-41061 | VPA-985 | SR-121463-B | OPC-31260 | YM-087 |
|--|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| Genel Adı | Tolvaptan | Lixivaptan | Satavaptan | Mozavaptan | Conivaptan |
| Ticari Adı | - | - | Aquilda | Phyuline | Vaprisol |
| Türevi | Benzazepin | Benzodiazepin | N-arilsülfonil-oksindol | Benzazepin | Benzazepin |
| Uygulama Yolu | Oral | Oral | Oral/İntravenöz | Oral | İntravenöz |
| Dozu | 15-60 mg Günde 1 defa | 50-100 mg Günde 2 defa | 5-25 mg Günde 1 defa | 30-60 mg Günde 1 defa | 40-80 mg |
| Proteine Bağlanma | % 99 | % 99 | % 88-90 | - | % 98.5 |
| İnhibisyon Katsayısı (nmol/L) | 0.43 | 0.60 | 4.1 | 25.4 | 1.11 |
| Selektivite indeksi (V _{1A} /V ₂) | 29 | 100 | 112 | 10 | 0.15 |
| Yarılanma Ömrü (saat) | 6-8 | 7-10 | 14-17 | - | 3.1-7.8 |
| Metabolizması | Hepatic (CYP3A4) | Hepatic (CYP3A4) | Hepatic (CYP3A4-%90) (CYP2D6-%10) | Hepatic (CYP3A4) | Hepatic (CYP3A4) |
| Eliminasyonu | Feçes | Feçes | Feçes | Feçes | Feçes |

2.5.2.2.1.1.1. Conivaptan

Conivaptan (Conivaptan hidroklorid) FDA tarafından 2005 yılında klinikte yatan övolemik ve hipervolemik hiponatremi hastalarının intravenöz tedavisi için onay alan ve kendi sınıfında piyasaya sürülen ilk ilaçtır (Palmer vd., 2016; Alavi, 2004). Bir benzazepin türevi olan conivaptan hidrokloridin molekül ağırlığı 535.04 g/mol ve formülü C₃₂H₂₇ClN₄O₂'dir (Ali, Raufi, Washington, Ghali, 2007) (Şekil 2.12). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından bu ajan "N-[4-(2-metil-4,5-dihidro-3H-imidazo[4,5-d][1]benzazepin-6-karbonil)fenil]-2-fenilbenzamid;hidroklorid" olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.12. Conivaptan'ın kimyasal yapısı (Ali vd., 2007).

Conivaptan ADH'nin hem V_{1A} hem de V_2 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmakta; ancak yapılan radyoligand yarışmalı bağlanma çalışmaları ile V_2 reseptörlerine V_{1A} reseptörlerine nazaran 10 kat daha yüksek bir afinite ile bağlandığı belirtilmiştir (Yakaryılmaz & Özden, 2009). Conivaptan'ın V_{1A} ve V_2 reseptörlerine ait inhibisyon katsayıları sırasıyla 6.3 ± 1.8 nM ve 1.1 ± 0.2 nM'dir (Brunton, 2006). Etki mekanizması sonucu, elektrolit atılımında oldukça az bir değişiklik ya da herhangi bir değişiklik yapmadan renal serbest su atılımını artırmaktadır (Brunton, 2006). Diğer ajanlara göre üstünlüğü iki reseptörü birlikte bloke ederek, reseptörlerine bağlanamayan ADH'lerin diğer reseptörleri uyarımını da engelleyebilmesidir.

Conivaptan'ın hayvanlarda genotoksik, karsinojenik ve teratoksik (malformasyon oluşumuna neden olan) bir özellik göstermediği FDA tarafından belirtilmiştir, ancak hamilelikte kullanılması önerilmemektedir. (Alavi, 2004). Ayrıca karaciğer sitokrom P450 izozimi olan CYP3A4'ün güçlü bir inhibitörü olması ve kronik kullanımında ciddi ilaç-ilaç etkileşimleri yapabilmesi sebebiyle kronik oral kullanımı durdurulmuştur ve intravenöz kullanımı ise 4 gün ile sınırlandırılmıştır (Rondon-Berrios & Berl, 2016; Yakaryılmaz & Özden, 2009; Decaux vd., 2008). FDA tarafından onaylanan uygulama, tedavinin başlangıcında en az 30 dakika 20 mg bolus olarak ve sürekli infüzyonla 20 mg/gün 4 gün boyunca verilmesidir (Palmer vd., 2016).

Conivaptan'ın hafif yan etkileri arasında ağızda kuruluk, susama ve poliüri belirtilmektedir (Rondon-Berrios & Berl, 2016). Bunun yanı sıra, infüzyon bölgesinde nadiren de olsa vasküler irritasyon, tromboz, ağrı; ayrıca hipokalemi, hipotansiyon ve başağrısı bildirilen yan etkiler arasındadır. Bu nedenle infüzyon için büyük venlerin tercih edilmesi, her gün infüzyon yerinin değiştirilmesi ve tedavi sürecinin kısa tutulması önerilmektedir (Palmer, 2015; Brunton, 2006; Rondon-Berrios & Berl, 2016).

Conivaptan dahil olmak üzere çeşitli ADH Antagonistlerinin beyin ödemindeki etkilerine ilişkin çeşitli çalışmalar ve sonuçları Tablo 2.7'de özetlenmiştir.

Tablo 2.7. Beyin Ödeminde ADH Antagonizmasına İlişkin Çalışmalar

| Kaynak | Hedeflenen Reseptör(ler) | Bulgular |
|-------------------------|---|---|
| Laszlo vd., 1999 | V ₂ antagonizmi (OPC-31260) (oral; 10 veya 30 mg/kg) | Sıçanlarda subaraknoid kanama ile indüklenen beyin ödeminde, plazma ADH düzeylerinin yükseldiği; su tutulumunun, beyin su içeriği ve Na ⁺ birikiminin önlendiği bildirilmiştir. |
| Shuaib vd., 2002 | V _{1A} antagonizmi (SR49059) (intraperitoneal; 2 veya 30mg/kg) | Sıçanlarda fokal embolik orta serebral arter oklüzyonunu takiben uygulandığında, infarkt büyüklüğü, nörolojik bozukluklar ve iskemik beyin ödemi azalmıştır. |
| Vakili vd., 2005 | V ₁ + V ₂ antagonizmi (intraserebroventriküler; 100 veya 500 ng) | Farelerde orta serebral arter oklüzyonunu takiben uygulandıklarında, V ₁ inhibisyonu ile infarkt hacmi, beyin ödemi oluşumu, KBB yıkımı ve fonksiyonel bozukluklarda doza bağımlı azalma görülürken; V ₂ inhibisyonunda anlamlı bir etki görülmemiştir. |
| Ferris vd., 2006 | V _{1A} antagonizmi (SRX251) (oral; 0.2 µg, 20 µg, 2 mg/kg) | Hamsterlarda, agresif davranışın doza bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir. |
| Taya vd., 2008 | V _{1A} antagonizmi (SR49059) (intravenöz; 2.76 mg/kg) | Sıçanlarda kortikal kontüzyon ile oluşturulan travmatik beyin hasarı sonrasında uygulandığında, beyin ödemi artışını baskıladığı ve AQP4 ekspresyonunun up-regülasyonunu önlediği belirtilmiştir. |
| Molnar vd., 2008 | V ₂ antagonizmi (OPC-31260) (intragastrik; 30 mg/kg) | Sıçanlarda, bilateral ana karotis ligasyonu yapılarak oluşturulan genel serebral hipoksiyi takiben uygulandığında, beyin su içeriğindeki artışın ve Na ⁺ birikiminin önlendiği, plazma ADH düzeylerinin daha da arttığı ve sağkalımda olumlu yönde etkisi görülmüştür. |
| Yeung vd., 2009 | V ₂ antagonizmi (OPC-31260) (intraperitoneal; 0.4 µg/kg) | Astroitik endotelin-1'in aşırı ekspresyonu olan transgenik farelerde, su intoksikasyonu öncesi uygulandığında, serebral su birikimini azalttığı, hipokampal astrosit uç-ayaklarında AQP4 ekspresyonunu azalttığı ve nörolojik bozuklukları iyileştirdiği belirtilmiştir. |
| Liu vd., 2010 | V ₁ + V ₂ antagonizmi (intraserebroventriküler; 500 veya 1000 ng V ₁ /1000ng V ₂) | Geçici orta serebral arter oklüzyonu yapılan farelerde, iskemi sırasında uygulandığında, reperfüzyondan sonra yalnızca V ₁ antagonizmasının infarkt hacminde ve su içeriğinde azalmaya, AQP4 ekspresyonunun upregülasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. |
| Manaenko vd.,2011 | V _{1A} antagonizmi (i.p. SR49059,subkutan NC1900) (0.5 veya 2; 1 veya 10 mg/kg) | Kollajenaz ile indüklenen intraserebral hemoraji fare modelinde, indüksiyondan 1 saat sonra verildiklerinde, 24 ve 72. saatlerde serebral ödemde azalma ve 72. saatte nörodavranışsal bozukluklarda iyileşme görülmüştür. |
| Potts vd., 2011; | V _{1A} /V ₂ antagonizmi (Conivaptan) (intravenöz; ilk doz 20 mg) | Uyumsuz ADH sendromu olan nörocerrahi hastalarında uygulandığında, hiponatremide azalma ve diürezde artış görülmüştür. Tek bir hastada hipernatremi gelişmiştir. |
| Dhar vd., 2011 | V _{1A} /V ₂ antagonizmi (Conivaptan) (intravenöz; 20 mg) | 22 yaşında travmatik beyin hasarından sonra hiponatremi gelişen bir hastada, serebral perfüzyon basıncı, intrakraniyal basınç ve serum sodyumunda düzelme görülmüştür. |
| Human vd., 2012 | V _{1A} /V ₂ antagonizmi (Conivaptan) (bolus; 10, 20 veya 40 mg) | Nöroloji yoğun bakımında yatan, beyin hasarı olan hiponatremili büyük bir hasta grubu retrospektif olarak değerlendirildiğinde, hiponatreminin düzeldiği belirtilmiştir. |
| Zeynalov vd., 2015 | V _{1A} /V ₂ ve V ₂ antagonizmi (intravenöz Conivaptan;oral Tolvaptan) (0.02 veya 0.2 mg; 0.2 mg) | Orta serebral arter oklüzyonu yapılan farelerde, reperfüzyon başlangıcıyla birlikte uygulandıklarında, conivaptan tedavisi ile nörolojik bozuklukları iyileştirdiği, beyin su içeriğini azalttığı, plazma ve idrar ozmolalitesini değiştirdiği bildirilmiş; tolvaptanda iyileştirici etkiler görülmemiştir. |
| Bu çalışma, 2017 | V _{1A} /V ₂ antagonizmi (Conivaptan) (10 veya 20 mg/mL) | Bilateral a.communis ligasyonu yapılarak oluşturulan global serebral iskemide, Conivaptan (10mg/mL), beyin hasarı ve ödeminde Mannitol'e göre daha etkili olmuştur. |

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 21.11.2016 tarihli 560 karar numarası ile Etik Kurul onayı verildi. Çalışma, 02.06.2017 tarihinde 2017-1524 proje numarası ile ESOĞÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi.

Cerrahi işlemler ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM); biyokimyasal analizler ESOĞÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma ve Klinik Laboratuvarları, histolojik analizler ise ESOĞÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı olanakları kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler ESOĞÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı desteği alınarak yapıldı.

3.1. Kullanılan Maddeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|--|-----------------------------|
| Conivaptan hidroklorid | : TRC-C384700, Kanada |
| Dimetilsülfoksit (\geq %99.5) | : Sigma D5879, ABD |
| D-Mannitol (\geq %98) | : Sigma-Aldrich M4125, ABD |
| Entellan® | : Merck-107961, Almanya |
| Eosin Y solüsyonu | : Merck-109844, Almanya |
| Hekzadesiltrimetilamonyumbromid (\geq %98) | : Sigma-Aldrich H5882, ABD |
| Hemotoksilin Solüsyonu | : Merck- 105174, Almanya |
| Hidrojen Peroksit (%30-31) | : Sigma-Aldrich 18312, ABD |
| Ketamin (50 mg/mL) | : Pfizer, ABD |
| Ksilazin (%2) | : Alfazyne |
| Proteinaz K | : Millipore, Merck, Almanya |
| Potasyum fosfat monobazik | : Riedel-de Haën, Almanya |
| Potasyum fosfat dibazik | : Sigma-Aldrich P8281, ABD |
| 3-3', 5-5'-tetrametilbenzidin dihidroklorür hidrat (%97) | : Sigma-Aldrich 861510, ABD |

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

| | |
|----------------------|--|
| Derin Dondurucu | : Thermo, ULT 1386-5-V40 |
| Doku boyama cihazı | : Leica Auto Stainer XL |
| Doku takip cihazı | : Thermo, Shandon Citadel 2000 |
| Hassas Terazi | : Sartorius BP121S |
| ISE modülü | : ROCHE/HITACHI COBAS |
| Işık mikroskobu | : Olympus |
| İnkübatör | : BINDER BD53 |
| Mikropleyt okuyucu | : PerkinElmer2030 Multilabel reader, Victor X3 |
| Mikropleyt yıkayıcı | : BioTek ELx50 |
| Mikrotom | : Leica RM 2145 |
| pH Metre | : HANNA pH 211 |
| Santrifüj | : Nüve NF800 |
| Santrifüj, soğutmalı | : Jouan MR22 |
| Shaker | : WiseMax |
| Spektrofotometre | : Shimadzu, UV-1601 |
| Su banyosu | : Nüve BM402 |
| Otoanalizör | : ROCHE/HITACHI COBAS |
| Ozmometre | : WESCOR VAPRO® 5600 |
| Vorteks | : WiseMix VM-10, WISD |

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 8 haftalık ortalama 270 gram ağırlığında 58 adet erkek Sprague Dawley cinsi albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilerek, deney öncesinde ve süresince ESOGÜ TICAM'da, 22 ± 1 °C oda sıcaklığı ve 12 saat aydınlık-karanlık şartları sağlanmış ortamda, şeffaf polikarbon kafeslerde barındırıldı; standart sıçan yemi ile beslenerek su ihtiyaçları için musluk suyu sağlandı. Deney süreci başlamadan önce, sıçanların genel morfolojik görünümleri makroskobik olarak gözlemlendi.

3.2.2. Anestezi

Sıçanlar, cerrahi işlemler başlanmadan önce yaklaşık 12 saat süreyle aç bırakıldı; yalnızca su içmelerine izin verildi. Deneyin başlangıcında, tüm gruplardaki sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Cerrahi işlem öncesi tüm sıçanlara ilk anesteziyi sağlamak için intramusküler 50 mg/kg Ketamin; analjezik ve kas gevşetici olarak ise intramusküler 10 mg/kg Ksilazin uygulandı. İkinci anestezi için bu dozlar intraperitoneal olarak verildi. İkinci anesteziye ihtiyaç duyulduğu durumlarda, başlangıçta uygulanan dozların %20'sini aşmayan dozlar aralıklı olarak tekrarlandı. Anestezi derinliğinin kontrolü doğrulama refleksi, göz kapağı refleksi ve ağrılı uyarana verilen tepki değerlendirilerek yapıldı. Anestezi sırasında gözlerin kurumasını önlemek amacıyla göz merhemi kullanıldı.

3.2.3. Gruplar

Çalışmada beş grup oluşturuldu. Gruplar özetle aşağıdaki gibidir:

1) Kontrol (Cerrahi-Sham) Grubu (n=10): Bilateral a.carotis communis'e ulaşıldı; arterler klemlenmeden kesi bölgesi dikilerek kapatıldı. Herhangi bir infüzyon işlemi uygulanmaksızın, 6 saat sonra anestezi altında sakrifikasyon gerçekleştirildi.

2) İskemi/Reperfüzyon Grubu (İ/R) (n=12): Bilateral a.carotis communis klemlendi; 30 dakika sonra klemler açılarak juguler venden 30 dakika süreyle serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) infüzyonu başlatıldı. Kesi bölgesi dikilerek kapatıldı. Reperfüzyondan 6 saat sonra anestezi altında sakrifikasyon gerçekleştirildi. Bu gruptan bir hayvan kaybedildi.

3) Mannitol Tedavi Grubu (MAN) (n=12): Bilateral a.carotis communis klemlendi; 30 dakika sonra klemler açılarak juguler venden 30 dakika süreyle %20'lik mannitol infüzyonu başlatıldı. Kesi bölgesi dikilerek kapatıldı. Reperfüzyondan 6 saat sonra anestezi altında sakrifikasyon gerçekleştirildi.

4) Conivaptan Tedavi Grubu-1 (CON10) (n=12): Bilateral a.carotis communis klemlendi; 30 dakika sonra klemler açılarak juguler venden 30 dakika süreyle 10 mg/mL conivaptan infüzyonu başlatıldı. Kesi bölgesi dikilerek kapatıldı. Reperfüzyondan 6 saat sonra anestezi altında sakrifikasyon gerçekleştirildi.

5) Conivaptan Tedavi Grubu-2 (CON20) (n=12): Bilateral a.carotis communis klemlendi; 30 dakika sonra klemler açılarak juguler venden 30 dakika süreyle 20 mg/mL conivaptan infüzyonu başlatıldı. Kesi bölgesi dikilerek kapatıldı. Reperfüzyondan 6 saat sonra anestezi altında sakrifikasyon gerçekleştirildi.

3.2.4. Cerrahi İşlemler ve İnfüzyon

Anestezi altındaki sıçanlar sırt üstü pozisyonda yatırılarak el ve ayaklarından cerrahi girişim tahtası üzerine tesbit edildi. Hayvanların ön boyun bölgelerinde servikal orta hat yaklaşık 3 cm kadar vertikal insizyonla açılarak bilateral a.carotis communis'e ulaşıldı. Bu aşamada, bu iki arter kontrol grubu hariç tüm gruplarda klemplenenek 30 dakika boyunca iskemik koşulların oluşması sağlandı; bu süre sonunda klempler açılarak reperfüzyon başlatıldı. Kesi bölgesi kapatılmadan önce, ilgili gruplarda reperfüzyon başlangıcı ile eş-zamanlı olarak infüzyon işlemine başlandı.

İnfüzyon işlemleri için Mannitol serum fizyolojik ve Conivaptan ise % 5'lik DMSO içerisinde vortekslenerek hazırlandı. Toplam yaklaşık 500 µm'lik hacimlerde serum fizyolojik (%0.9'luk NaCl), Mannitol ve Conivaptan'ın her biri ilgili gruplara, hemodinamik instabiliteleri önlemek amacıyla 30 dakika süreyle ve 5'er dakikalık aralıklarla, juguler venden infüze edildi. İnfüzyon süresi tamamlandıktan sonra kesi bölgesi steril koşullarda sütür ile dikilerek kapatıldı. Mannitol ve Conivaptan tedavi gruplarına, ilaçların diüretik etkisi sonucu hipovolemi oluşmasını önlemek amacıyla, 1'er mL intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı ve sıçanlar farklı kafeslerde bakıma alındı. Reperfüzyon 6 saat sürdürüldü. Altıncı saatin sonunda, tekrar anestezi altına alınan hayvanların göğüs kafesleri açılarak kardiyak kan örnekleri alındı; baş bölgesi vücuttan ayrılarak, kafatası alt sağ kısmından makasla pencere şeklinde açıldı ve beyin dokuları dikkatlice çıkarıldı.

3.2.5. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Reperfüzyonun altıncı saatinin sonunda, gruplardaki tüm hayvanlardan anestezi altında alınan kardiyak kan örnekleri jelli serum tüplerine aktararak 1000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örneklerinden Na⁺, K⁺, Cl⁻, albumin ve ozmolalite ölçümleri aynı gün içerisinde yapıldı. Kalan serum örnekleri alikotlanarak, diğer biyokimyasal analizler için -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Beyin dokusunun otoliz olma riski yüksek olduğundan, histolojik analizlerin daha sağlıklı değerlendirilebilmesi amacıyla, reperfüzyonun altıncı saatinin sonunda, gruplarda hayatta kalan hayvan sayısının yarısı kadarı, transkardiyak perfüzyon işlemine tabi tutuldu. Bu hayvanlardan anestezi altında kan örnekleri alındıktan hemen sonra peristaltik bir pompaya bağlı olan kelebek kanül, kalbin sol ventrikül apeksine yerleştirildi. Perfüzyon sırasında kanın ve perfüzyon sıvılarının çıkışını sağlamak için, kalbin sağ atriumuna kesi atıldı. Önce % 0.09'luk NaCl solüsyonunun, tüm kanın boşalması sağlanıncaya kadar, 3-5 dakika süreyle dolaşması sağlandı. Bu işlemi takiben, dokular istenen sertliğe ulaşınca kadar (~100 mL) nötral

formaldehid solüsyonu ile perfüzyon işlemine devam edildi. Perfüzyon işlemi tamamlandıktan sonra dikkatlice çıkarılan beyin dokuları, histolojik analiz prosedürlerinin uygulanacağı zamana kadar, %10'luk formaldehid solüsyonu içerisinde, karanlık ve serin bir ortamda muhafaza edildi. Gruplarda kalan diğer hayvanlarda ise perfüzyon işlemi yapılmayıp, aynı cerrahi işlemlerle alınan beyin dokularına, beyin ödemi prosedürü uygulandı.

3.2.6. Yapılan Analizler

3.2.6.1. Serum örneklerinde yapılan analizler

Sıçanlardan alınan serum örneklerinde TNF- α , İnterlökin-15, İnterlökin-35, Progranulin, Nöron spesifik enolaz ve Antidiüretik hormon düzeylerinin ölçümü Ticari Kit kullanılarak yapıldı. Serum örneklerinde ayrıca Miyeloperoksidaz aktivitesi, Elektrolit düzeyleri (Na⁺, K⁺, Cl⁻) ve ozmolalite ölçümleri yapıldı.

3.2.6.1.1. Elektrolit (Na⁺, K⁺, Cl⁻) düzeylerinin ölçümü

Elektrolit düzeylerinin kantitatif ölçüm yöntemi; hem test edilecek solüsyon hem sabit test iyonu konsantrasyonu içeren bir iç dolgu solüsyonu ile temas halinde olan, iyon seçici elektrod (ISE) membranında, her iki solüsyondaki iyon konsantrasyonları farklı yoluyla oluşan elektriksel potansiyel değişikliklerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Serum örneklerindeki Na⁺, K⁺ ve Cl⁻ düzeylerinin ölçümü, Roche/Hitachi ISE modülü kullanılarak yapıldı (ISE-indirect) ve ölçüm sonuçları mmol/L olarak verildi.

3.2.6.1.2. Albümin ölçümü

Albümin ölçüm yöntemi, albüminin bir anyonik boya olan bromkresol yeşiline (BCG) bağlanarak mavi-yeşil renkli bir kompleks oluşturması ve bu kompleksin fotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Serum örneklerinde albümin miktarı Roche/Hitachi Cobas C analizöründe ticari kit kullanılarak ölçüldü (ALB2 testi, Roche Diagnostics, Almanya) (Katalog No: 03183688122). Sonuçlar g/dl olarak verildi.

3.2.6.1.3. Ozmolalite ölçümü

Buhar basıncı prensibine dayanan ozmolalite ölçümleri, çözelti içinde bulunan katı maddelerin buhar basıncında azalmaya neden olarak, saf bir çözücünün (su) çığ-noktası (dew point) sıcaklığını düşürmesi prensibine dayanmaktadır. Serum örneklerinde ozmolalite ölçümleri WESCOR marka VAPRO[®] 5600 model buhar basıncı ozmometre cihazında ölçüldü ve sonuçlar mmol/kg olarak verildi.

3.2.6.1.4. Antidiüretik hormon düzeylerinin ölçümü

Serum ADH düzeyleri, ELISA Kiti kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan ADH ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) (Katalog No: CEB139Ra). ADH konsantrasyonları pg/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.1'de açıklanmıştır.

Tablo 3.1. Sıçan Antidiüretik Hormon ELISA Kiti Deney Prosedürü

| |
|---|
| <p>Test Prensipleri: Bu test, kompetitif (yarışmalı) Enzim İnhibisyon İmmünoassay prensibine dayanır. Kuyucuklara önceden kaplanmış olan sıçan ADH'a spesifik monoklonal antikor ile, biyotin-işaretli ADH ve işaretli olmayan ADH (Standartlar veya numuneler) arasında kompetitif bir inhibisyon reaksiyonu başlatılır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjüгат yıkanır. Ardından, Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz, her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Bağlanan HRP konjüгатı miktarı, numunedeki ADH konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Substrat solüsyonunun eklenmesinden sonra, oluşan rengin yoğunluğu, numunedeki ADH konsantrasyonu ile ters orantılıdır.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart ve Dilüenti• Tespit Reaktifi A ve Dilüenti• Tespit Reaktifi B ve Dilüenti• Reaktif Dilüenti• TMB Substratı• Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X)• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X), distile su ile 1:30 oranında seyreltildi.4. Tespit Reaktifi A ve B santrifüjlendikten sonra, Tespit Reaktifi A içerisine 150 µl Reaktif Dilüenti eklendi ve dilüent ile 1:100 oranında seyreltildi. Tespit Reaktifi B ise sadece dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.5. Stok Standart, üzerine 1 mL Standart Dilüenti eklenerek hazırlandı. Seri dilüsyonlar ile 1000, 333.33, 111.11, 37.04, 12.35 pg/mL konsantrasyonları elde edildi.6. Standart, blank ve numuneler vorteksenerek ilgili kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.7. Her kuyucuğa hemen 50 µL dilüe Tespit Reaktifi A eklendi.8. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.9. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.10. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.11. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Tespit Reaktifi B eklendi.12. Pleyt kapatılarak, 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.13. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.14. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.15. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi.16. Pleyt karanlıkta 10-20 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.17. Her kuyucuğa 50 µL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi.18. Mikropleyt okuyucuda 450 nm'de hemen absorban ölçümleri yapıldı ve sonuçlar pg/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.5. Nöron spesifik enolaz düzeylerinin ölçümü

Serum NSE düzeyleri ELISA Kiti kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan NSE ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) (Katalog No: SEA537Ra). NSE konsantrasyonları ng/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.2'de açıklanmıştır.

Tablo 3.2. Sıçan Nöron Spesifik Enolaz ELISA Kiti Deney Prosedürü

| |
|--|
| <p>Test Prensipleri: Test, Sandviç Enzim İmmunoassay prensibine dayanır. Sıçan NSE'ye spesifik biyotin-bağlı antikor içeren kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenir. Daha sonra Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz (HRP) her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat solüsyonu ilave edildikten sonra yalnızca NSE, biyotin-bağlı antikor ve enzim-bağlı Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği ortaya çıkar. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk değişimi 450 ± 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki NSE konsantrasyonları, standart grafiği yardımıyla belirlenir.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart ve Dilüenti• Tespit Reaktifi A ve Dilüenti• Tespit Reaktifi B ve Dilüenti• TMB Substratı• Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X)• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X), distile su ile 1:30 oranında seyreltildi.4. Tespit Reaktifi A ve B santrifüjlendikten sonra, dilüentleri ile 1:100 oranında seyreltildi.5. Stok Standart, üzerine 0.5 mL Standart Dilüenti eklenerek hazırlandı. Seri dilüsyonlar ile 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.625 ng/mL konsantrasyonları elde edildi.6. Standart, blank ve numuneler vorteksenerek ilgili kuyucuklara 100'er µL pipetlendi.7. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.8. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.9. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Tespit Reaktifi A eklendi.10. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.11. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.12. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.13. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Tespit Reaktifi B eklendi.14. Pleyt kapatılarak, 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.15. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.16. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.17. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi.18. Pleyt karanlıkta 10-20 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.19. Her kuyucuğa 50 µL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi.20. Mikropleyt okuyucuda 450 nm'de hemen absorpsiyon ölçümleri yapıldı ve sonuçlar ng/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.6. Progranulin düzeylerinin ölçümü

Serum granulin (GRN) düzeyleri ELISA Kiti kullanılarak, 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan Granulins ELISA Kit, Cusabio Biotech Co., China) (Katalog No: CSB-EL009939RA). Örneklerdeki granulin konsantrasyonları ng/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.3'te açıklanmıştır.

Tablo 3.3. Sıçan Granulin ELISA Kiti Deney Prosedürü

| |
|--|
| <p>Test Prensi: Bu test, kantitatif Sandviç Enzim İmmunoassay prensibine dayanır. Sıçan GRN'ye spesifik antikor bir mikroye önce kaplanmıştır. Standart ve numuneler kuyucuklara pipetlenir ve her bir IL-35 mevcut olan immobilize antikor ile bağlanır. Bağlanmamış olanlar uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara GRN için spesifik Biotin-bağlı antikor eklenir. Yıkama işleminden sonra, Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz (HRP) kuyucuklara eklenir. Bağlanmayan Avidin-enzim reaktifini uzaklaştırmak için yapılan yıkamayı takiben, bir substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir ve ilk aşamada bağlanan GRN miktarı ile orantılı olarak bir renk oluşur. Reaksiyon durdurulur ve rengin yoğunluğu ölçülür.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart• Konsantre Biotin-antikoru (100X) ve Dilüenti• Konsantre HRP-Avidin (100X) ve Dilüenti• Numune Dilüenti• Konsantre Yıkama Solüsyonu (25X)• TMB Substratı• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (25X), distile su ile 1:25 oranında seyreltildi.4. Standart vialı açılmadan önce 600-10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Üzerine 1 mL Numune Dilüenti eklendi. Seri dilüsyonlar ile 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 7.8 ng/mL konsantrasyonları elde edildi.5. Standart, blank ve numuneler vorteksenerek ilgili kuyucuklara 100'er µL pipetlendi.6. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak 2 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.7. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.8. Biotin-antikoru (1X) hazırlandı: Biotin vialı açılmadan önce santrifüjlendi ve dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.9. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Biotin-antikoru eklendi.10. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.11. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 200 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.12. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.13. HRP-avidin solüsyonu (1X) hazırlandı: HRP vialı açılmadan önce santrifüjlendi ve dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.14. Her kuyucuğa 100 µL dilüe HRP-avidin eklendi.15. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.16. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 200 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.17. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.18. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi.19. Pleyt karanlıkta 15-30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.20. Her kuyucuğa 50 µL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi. Mikroye okuyucuda 450 nm'de 5 dakika içerisinde absorbans ölçümleri yapıldı ve sonuçlar ng/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.7. TNF- α düzeylerinin ölçümü

Serum TNF- α düzeyleri ELISA Kiti kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan TNF- α ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) (Katalog No: SEA133Ra). TNF- α konsantrasyonları pg/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.4'te açıklanmıştır.

Tablo 3.4. Sıçan TNF- α ELISA Kiti Deney Prosedürü

| |
|--|
| <p>Test Prensipleri: Test, Sandviç Enzim İmmunoassay prensibine dayanır. Sıçan TNF-α'ya spesifik biyotin-bağlı antikor içeren kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenir. Daha sonra Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz (HRP) her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat solüsyonu ilave edildikten sonra yalnızca TNF-α, biyotin-bağlı antikor ve enzim-bağlı Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği ortaya çıkar. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk değişimi 450 \pm 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki TNF-α konsantrasyonları, standart grafiği yardımıyla belirlenir.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart ve Dilüenti• Tespit Reaktif A ve Dilüenti• Tespit Reaktif B ve Dilüenti• TMB Substratı• Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X)• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X), distile su ile 1:30 oranında seyreltildi.4. Tespit Reaktif A ve B santrifüjlendikten sonra, dilüentleri ile 1:100 oranında seyreltildi.5. Stok Standart, üzerine 1 mL Standart Dilüenti eklenerek hazırlandı. Seri dilüsyonlar ile 10000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/mL konsantrasyonları elde edildi.6. Standart, blank ve numuneler vorteksenerek ilgili kuyucuklara 100'er μL pipetlendi.7. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak 1 saat süreyle 37 $^{\circ}$C'de inkübe edildi.8. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.9. Her kuyucuğa 100 μL dilüe Tespit Reaktif A eklendi.10. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 $^{\circ}$C'de inkübe edildi.11. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 μL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.12. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.13. Her kuyucuğa 100 μL dilüe Tespit Reaktif B eklendi.14. Pleyt kapatılarak, 30 dakika süreyle 37 $^{\circ}$C'de inkübe edildi.15. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 μL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.16. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.17. Her kuyucuğa 90 μL TMB Substratı eklendi.18. Pleyt karanlıkta 10-20 dakika süreyle 37 $^{\circ}$C'de inkübe edildi.19. Her kuyucuğa 50 μL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi.20. Mikropleyt okuyucuda 450 nm'de hemen absorban ölçümleri yapıldı ve sonuçlar pg/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.8. İnterlökin-15 düzeylerinin ölçümü

Serum IL-15 düzeyleri, ELISA Kiti kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan IL-15 ELISA Kit, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) (Katalog No:SEA061Ra). IL-15 konsantrasyonları pg/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.5'te açıklanmıştır.

Tablo 3.5. Sıçan IL-15 ELISA Kiti Deney Prosedürü

| |
|--|
| <p>Test Prensi: Test, Sandviç Enzim İmmunoassay prensibine dayanır. Sıçan IL-15'e spesifik biyotin-bağlı antikor içeren kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenir. Daha sonra Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz (HRP) her bir kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. TMB substrat solüsyonu ilave edildikten sonra yalnızca IL-15, biyotin-bağlı antikor ve enzim-bağlı Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği ortaya çıkar. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk değişimi 450 ± 10 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Numunelerdeki IL-15 konsantrasyonları, standart grafiği yardımıyla belirlenir.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart ve Dilüenti• Tespit Reaktifi A ve Dilüenti• Tespit Reaktifi B ve Dilüenti• TMB Substratı• Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X)• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (30X), distile su ile 1:30 oranında seyreltildi.4. Tespit Reaktifi A ve B santrifüjlendikten sonra, dilüentleri ile 1:100 oranında seyreltildi.5. Stok Standart, üzerine 0.5 mL Standart Dilüenti eklenerek hazırlandı. Seri dilüsyonlar ile 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/mL konsantrasyonları elde edildi.6. Standart, blank ve numuneler vorteksenerek ilgili kuyucuklara 100'er µL pipetlendi.7. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.8. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.9. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Tespit Reaktifi A eklendi.10. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.11. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.12. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.13. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Tespit Reaktifi B eklendi.14. Pleyt kapatılarak, 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.15. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk aspire edilerek, 350 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı; yıkamalarda pleyt solüsyon içinde 1-2 dakika bekletildi.16. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.17. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi.18. Pleyt karanlıkta 10-20 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.19. Her kuyucuğa 50 µL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi.20. Mikropleyt okuyucuda 450 nm'de hemen absorpsiyon ölçümleri yapıldı ve sonuçlar pg/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.9. İnterlökin-35 düzeylerinin ölçümü

Serum IL-35 düzeyleri, ELISA Kiti kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Sıçan Interleukin-35 ELISA Kit, Cusabio Biotech Co., China) (Katalog No: CSB-E13652r). IL-35 konsantrasyonları ng/mL olarak ifade edildi. Ölçümler için uygulanan deney prosedürü Tablo 3.6'da açıklanmıştır.

Tablo 3.6. Sıçan IL-35 Kiti Deney Prosedürü

| |
|---|
| <p>Test Prensi: Bu test, kantitatif Sandviç Enzim İmmunoassay prensibine dayanır. Sıçan IL-35'e özgü antikor bir mikroplyet'e önceden kaplanmıştır. Standart ve numuneler kuyucuklara pipetlenir ve her bir IL-35 mevcut olan immobilize antikor ile bağlanır. Bağlanmamış olanlar uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara IL-35 için spesifik Biotin-bağlı antikor eklenir. Yıkama işleminden sonra, Avidin-bağlı Horseradish Peroksidaz (HRP) kuyucuklara eklenir. Bağlanmayan Avidin-enzim reaktifini uzaklaştırmak için yapılan yıkamayı takiben, bir substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir ve ilk aşamada bağlanan IL-35 miktarı ile orantılı olarak bir renk oluşur. Reaksiyonu durdurulur ve rengin yoğunluğu ölçülür.</p> |
| <p>Kit İçeriği:</p> <ul style="list-style-type: none">• Standart• Konsantre Biotin-antikoru (100X) ve Dilüenti• Konsantre HRP-Avidin (100X) ve Dilüenti• Numune Dilüenti• Konsantre Yıkama Solüsyonu (25X)• TMB Substratı• Durdurma Solüsyonu |
| <p>Deney Prosedürü:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Tüm kit bileşenleri ve serumlar oda ısısına getirildi.2. Uygun sayıda strip çıkarılarak pleyt hazırlandı.3. Konsantre Yıkama Solüsyonu (25X), distile su ile 1:25 oranında seyreltildi.4. Standart vialı açılmadan önce 600-10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Üzerine 1 mL Numune Dilüenti eklendi. Seri dilüsyonlar ile 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 ng/mL konsantrasyonları elde edildi.5. Standart, blank ve numuneler vortekslenerek ilgili kuyucuklara 100'er µL pipetlendi.6. Pleyt yapışkan bantla kapatılarak 2 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.7. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edildi, yıkama yapılmadı.8. Biotin-antikoru (1X) hazırlandı: Biotin vialı açılmadan önce santrifüjlendi ve dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.9. Her kuyucuğa 100 µL dilüe Biotin-antikoru eklendi.10. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.11. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 200 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.12. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.13. HRP-avidin solüsyonu (1X) hazırlandı: HRP vialı açılmadan önce santrifüjlendi ve dilüenti ile 1:100 oranında seyreltildi.14. Her kuyucuğa 100 µL dilüe HRP-avidin eklendi.15. Pleyt kapatılarak, 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.16. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 200 µL dilüe yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı.17. Yıkama sonrası pleyt ters çevrilerek, içinde kalan sıvı filtre kağıdı ile uzaklaştırıldı.18. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi.19. Pleyt karanlıkta 15-30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi.20. Her kuyucuğa 50 µL dilüe Durdurma Solüsyonu eklendi. Mikroplyet okuyucuda 450 nm'de 5 dakika içerisinde absorbans ölçümleri yapıldı ve sonuçlar ng/mL olarak verildi. |

3.2.6.1.10. Miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümü

Nötrofil infiltrasyonu ve inflamasyon göstergelerinden biri olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi serum örneklerinde Suzuki ve ark. tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü (Suzuki vd., 1983). Yöntem, MPO'nun katalizlediği reaksiyon ile, sentetik bir substrat olan 3,3'-5,5'-tetrametil benzidin (TMB) molekülünün oksidasyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Reaksiyon, hidrojen peroksitin 37°C'de reaksiyon karışımına eklenmesi ile başlatıldı. Reaksiyon sırasında absorbans artışı 655 nm'de 5 dakika boyunca izlendi ve bir dakikadaki MPO aktivitesi hesaplandı. Serum MPO aktivitesi U/mL olarak verildi.

Hazırlanan çözeltiler:

1. 160 mM pH 5.4 Potasyum-Fosfat Tamponu:

Tampon 160 mM KH_2PO_4 ($m_A=136,09$) ve 160 mM K_2HPO_4 ($m_A=174,18$ g/mol) çözeltileri ile hazırlandı ve pH 5.4 'e ayarlandı.

2. %1'lik Hekzadesiltrimetilamonyum bromid (HETAB):

1 g/100 mL HETAB 160 mM pH 5.4 Potasyum-Fosfat Tamponu içinde çözülerek hazırlandı.

3. 16 mM 3,3'-5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB):

TMB ($m_A=240.3$ g/mol) N-N-dimetil formamid içinde çözülerek taze olarak hazırlandı. NaOH damlatılarak çözünmesi sağlandı.

4. % 0.06'lık Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

% 0.06'lık H_2O_2 , % 30'luk stok kullanılarak distile su içerisinde taze olarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

- 1) Her bir tüpe, H_2O_2 hariç, tabloda belirtilen hacimlerdeki çözeltiler sırasıyla eklendi ve 37 °C'de 1-2 dakika inkübe edildi.
- 2) İnkübasyon sonrasında, reaksiyon H_2O_2 eklenerek başlatıldı.
- 3) 37 °C'de 655 nm'de absorbans artışı 10 dakika süreyle izlendi.
- 3) Sonuçlar U/mL olarak hesaplandı.

| Reaksiyon Ortamı | Kör | Numune |
|---|-------------------|--------------------|
| K- PO_4 tamponu pH 5.4 (%1 HETAB içeren) | 500 μl | 500 μl |
| TMB | 100 μl | 100 μl |
| Serum | --- | 20 μl |
| Distile su | 350 μl | 330 μl |
| Hidrojen peroksit | 50 μl | 50 μl |
| | Toplam | 1000 μl |

3.2.6.2. Doku örneklerinde yapılan analizler

3.2.6.2.1. Beyin ödeminin tespiti

Deney bitiminde kardiyak perfüzyon yapılmayan hayvanlardan alınan beyin dokuları tartılarak yaş ağırlık belirlendi. Bu dokular BINDER marka BD53 model inkübatörde ~100 °C'de 24 saat süreyle kurutuldu ve kuru ağırlıkları tartıldı. Serebral su içeriği [$\%H_2O = (1 - \text{Kuru Ağırlık} / \text{Yaş Ağırlık}) \times 100$] formülüne göre hesaplandı. Beyin dokusu büyüklüğü bireysel farklılık gösterebildiği için, hayvanların ağırlıkları ile de oranlama yapıldı.

3.2.6.2.2. Histolojik analizler

Reperfüzyondan 6 saat sonra, otoliz riskini elimine etmek amacıyla perfüzyon fiksasyonu uygulanan sıçanların beyinleri bütün olarak çıkarıldıktan sonra, beyin dilimleyici ile frontal bölgeleri ve hipokampüsün bulunduğu bölgeler kesilerek ayrıldı. Etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen dokular, ksilol içerisinde şeffaf hâle getirildikten sonra, sıvı parafin serilerinden geçirilip parafin bloklar elde edildi.

Frontal korteks ve hipokampüs alanlarından 5 µm kalınlığında alınan kesitlere, doku genel durumunu ve nekrotik hücreleri belirlemek için Hematoksilen-Eosin boyama (Tablo 3.7); apoptotik hücreleri belirlemek için ise TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) boyama işlemleri (Tablo 3.8) uygulandı (ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Chemicon International) (Katalog No: S7101). Boyama yapılan kesitler binoküler ışık mikroskobu altında incelenerek değerlendirildi. Grubu temsil eden görüntüler, mikroskoba monte edilmiş dijital kamera ile çekildi.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, deneysel uygulamalardan bağımsız bir istatistik uzmanına danışılarak yapıldı. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, Nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdellik değerler olarak ifade edildi. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren değişkenler Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Analysis of Variance) testi ile analiz edildi; normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise Kruskal-Wallis Tek Yönlü Sıralamalı Varyans Analizi (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Test) uygulandı. $p < 0.05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veri analizleri SPSS 21.0 paket programları ile yapıldı.

Tablo 3.7. Hematoksilen-Eozin boyama yönteminin basamakları

| Yöntem Basamakları | İşlem Süresi |
|------------------------|--------------|
| Ksilol I | 10 dakika |
| Ksilol II | 10 dakika |
| %96'lık etil alkol I | 5 dakika |
| %96'lık etil alkol II | 5 dakika |
| %90'lık etil alkol | 5 dakika |
| %80'lik etil alkol | 5 dakika |
| %70'lik etil alkol | 5 dakika |
| Distile su | 5 dakika |
| Hematoksilin solüsyonu | 2 dakika |
| Çeşme suyunda yıkama | |
| Eozin solüsyonu | 5 dakika |
| %70'lik etil alkol | 2 dakika |
| %80'lik etil alkol | 2 dakika |
| %90'lık etil alkol | 2 dakika |
| %96'lık etil alkol I | 2 dakika |
| %96'lık etil alkol II | 2 dakika |
| Ksilol I | 10 dakika |
| Ksilol II | 10 dakika |
| Lam kapatma | |

Tablo 3.8. TUNEL boyama yönteminin basamakları

| Yöntem Basamakları | İşlem Süresi |
|--|--------------|
| Ksilol | 3×15 dakika |
| % 100'lük etil alkol | 2×3 dakika |
| % 95'lik etil alkol | 3 dakika |
| % 70'lik etil alkol | 3 dakika |
| PBS solüsyonu | 5 dakika |
| Proteinaz K solüsyonu | 15 dakika |
| Distile suda yıkama | 2×5 dakika |
| % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonu | 5 dakika |
| PBS solüsyonu | 5-10 dakika |
| Dengeleme tamponunda inkübasyon | 5 dakika |
| TdT enzimi uygulanarak 37 °C derece ve nemli ortamda | 1 saat |
| Durdurma/yıkama tamponunda çalkalama | 15 saniye |
| Oda ısısında inkübasyon | 10 dakika |
| PBS solüsyonu | 3×5 dakika |
| Anti- dioksijenin peroksidaz | 30 dakika |
| PBS solüsyonunda yıkama | 4×5 dakika |
| 3,3' diaminobenzidin solüsyonu | 10 dakika |
| Distile suda yıkama | 3×1 dakika |
| Metil yeşili | 15 dakika |
| Distile suda yıkama | 3×10 saniye |
| Bütanol | 2×3 saniye |
| Ksilol I | 5 dakika |
| Ksilol II | 5 dakika |
| Ksilol III | 5 dakika |
| Lam kapatma | |

4- BULGULAR

4.1. Serum Örnekleri Bulguları

4.1.1. Elektrolit (Na⁺, K⁺, Cl⁻) Düzeyleri

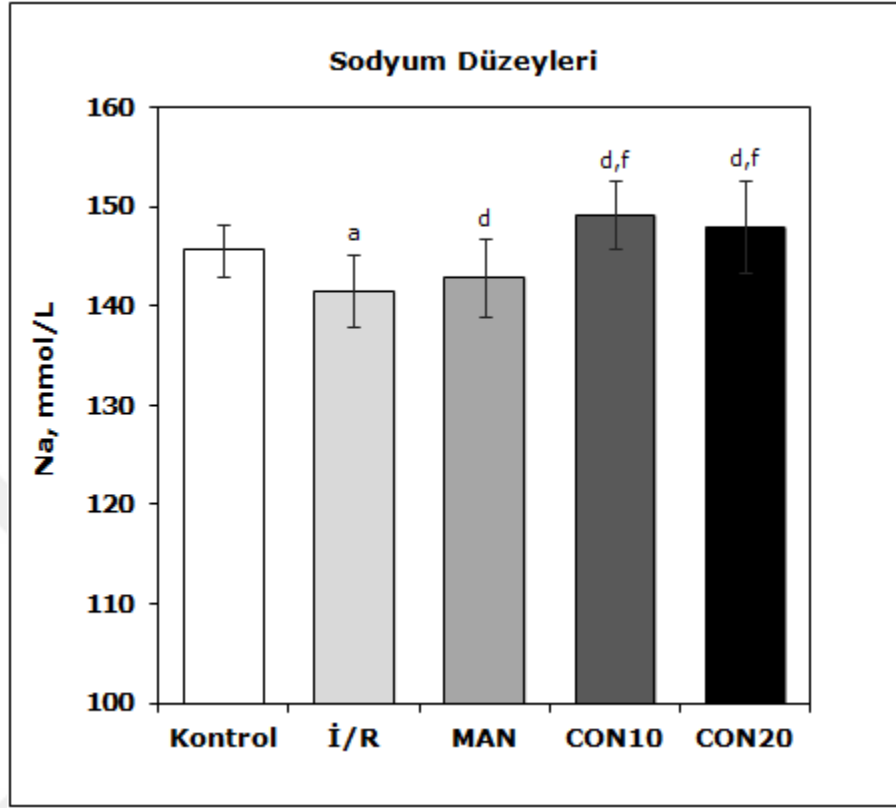
4.1.1.1. Sodyum (Na⁺) Düzeyleri

Deney gruplarının serum sodyum düzeyleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Serum sodyum düzeyleri (mmol/L)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|--|----|----------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 145,60±2,55 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 141,55±3,56 ^a |
| Mannitol | 12 | 142,92±3,90 ^d |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 149,17±3,38 ^{d,f} |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 148,00±4,57 ^{d,f} |
| a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001); d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı artış (p<0,001); f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış (p<0,001) | | |

Sodyum düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, İskemi-Reperfüzyon (İ/R) grubunda sodyum düzeylerinin Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi (p<0,001). Buna karşın, İ/R grubuna göre Mannitol (MAN), 10 ve 20 mg/mL Conivaptan (CON10 ve CON20) tedavi gruplarının her birinde anlamlı düzeyde artış gözlemlendi (p<0,001). Aynı şekilde, Mannitol grubuna göre 10 ve 20 mg/mL Conivaptan tedavi gruplarında da anlamlı düzeyde artış meydana geldiği görüldü (p<0,001).



Şekil 4.1. Serum sodyum düzeylerine ait Histogram grafiği. a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$); d, İ/R grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$); f, MAN grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$).

4.1.1.2. Potasyum (K⁺) Düzeyleri

Deney gruplarının serum potasyum düzeyleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Serum potasyum düzeyleri (mmol/L)

| Gruplar | n | Medyan (%25-%75) |
|------------------------|----|------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 6,40 (6,04-7,45) |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 6,46 (5,87-6,69) |
| Mannitol | 12 | 6,42 (6,04-6,94) |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 6,09 (5,93-6,29) |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 6,82 (6,25-7,54) |

Potasyum düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$).

4.1.1.3. Klorür (Cl⁻) Düzeyleri

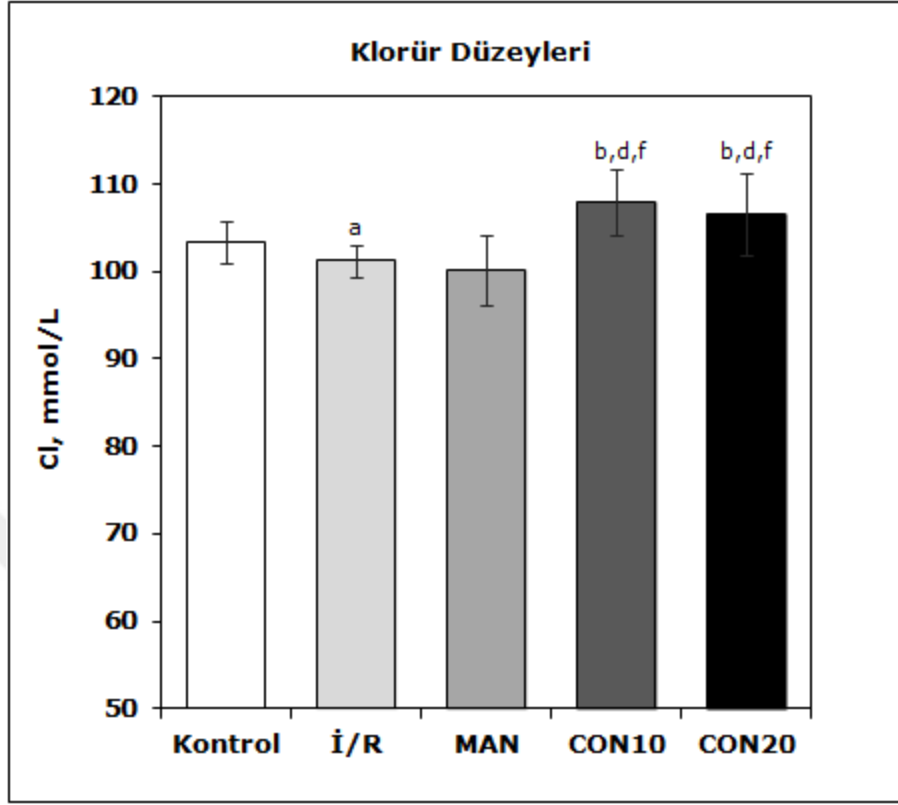
Deney gruplarının serum klorür düzeyleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Serum Cl⁻ düzeyleri (mmol/L)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|------------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 103,31±2,40 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 101,17±1,81 ^a |
| Mannitol | 12 | 100,13±4,01 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 107,93±3,75 ^{b,d,f} |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 106,60±4,72 ^{b,d,f} |

a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$);
b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$);
d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$);
f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$)

Cl⁻ düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, İ/R grubunda Kontrol grubuna göre azalma meydana geldiği gözlemlendi ($p<0,001$). Bunun aksine, CON10 ve CON20 tedavi gruplarında, Kontrol, İ/R ve MAN grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış tespit edildi ($p<0,001$).



Şekil 4.2. Serum klorür düzeylerine ait Histogram grafiği. a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$); b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$); d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$); f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$).

4.1.2. Albümin

Deney gruplarının serum albümin bulguları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Serum albümin düzeyleri (g/dL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|-------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 3,72±0,18 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 3,58±0,28 |
| Mannitol | 12 | 3,63±0,25 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 3,76±0,27 |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 3,84±0,31 |

Albüminin istatistiksel analizlerinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$).

4.1.3. Serum Ozmolalitesi

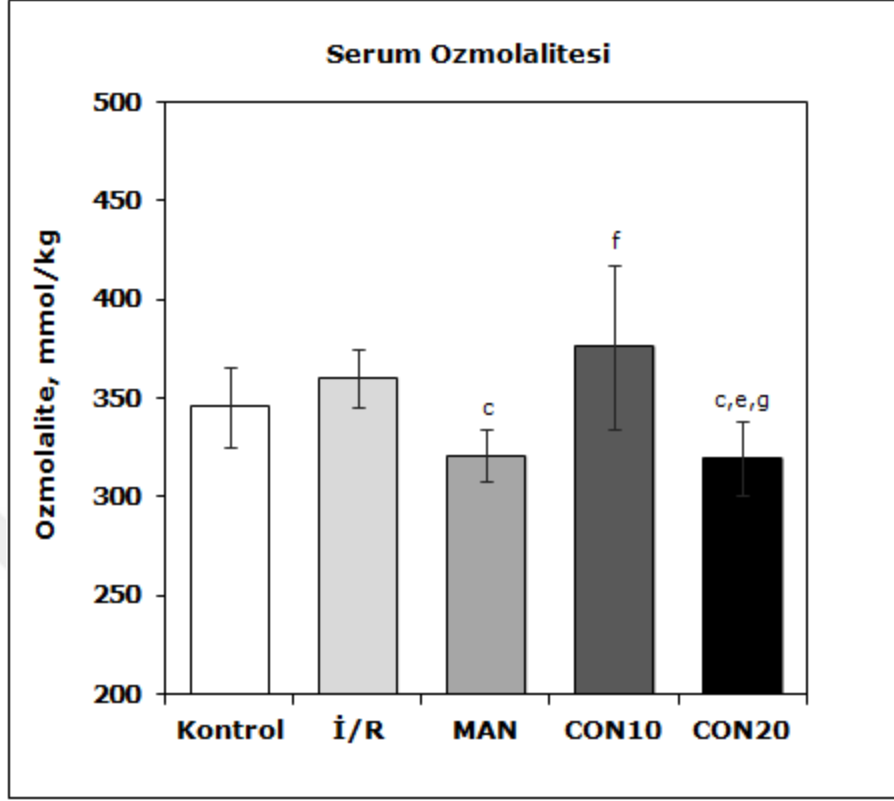
Deney gruplarının serum ozmolalitesi bulguları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Serum ozmolalitesi (mmol/kg)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|-------------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 345,55±20,58 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 360,00±14,62 |
| Mannitol | 12 | 321,08±12,85 ^c |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 376,13±41,61 ^f |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 319,17±18,74 ^{c,e,g} |

c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$);
e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$);
f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$);
g, Conivaptan 10 mg/mL grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$)

Serum ozmolalitesinin istatistiksel analizlerinde, MAN ve CON20 gruplarında İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görüldü ($p<0,001$). CON10 grubu diğer gruplara kıyasla en yüksek ozmolaliteye sahipti, ancak bu değer, yalnızca MAN ve CON20 grupları ile anlamlılık gösterdi ($p<0,001$). İ/R reperfüzyon grubunda Kontrol grubuna göre ozmolalitenin artış gösterdiği görüldü, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 4.3. Serum ozmolalitesine ait Histogram grafiği. c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$); e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$); f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış ($p<0,001$); g, Conivaptan 10 mg/mL grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$).

4.1.4. Antidiüretik Hormon Düzeyleri

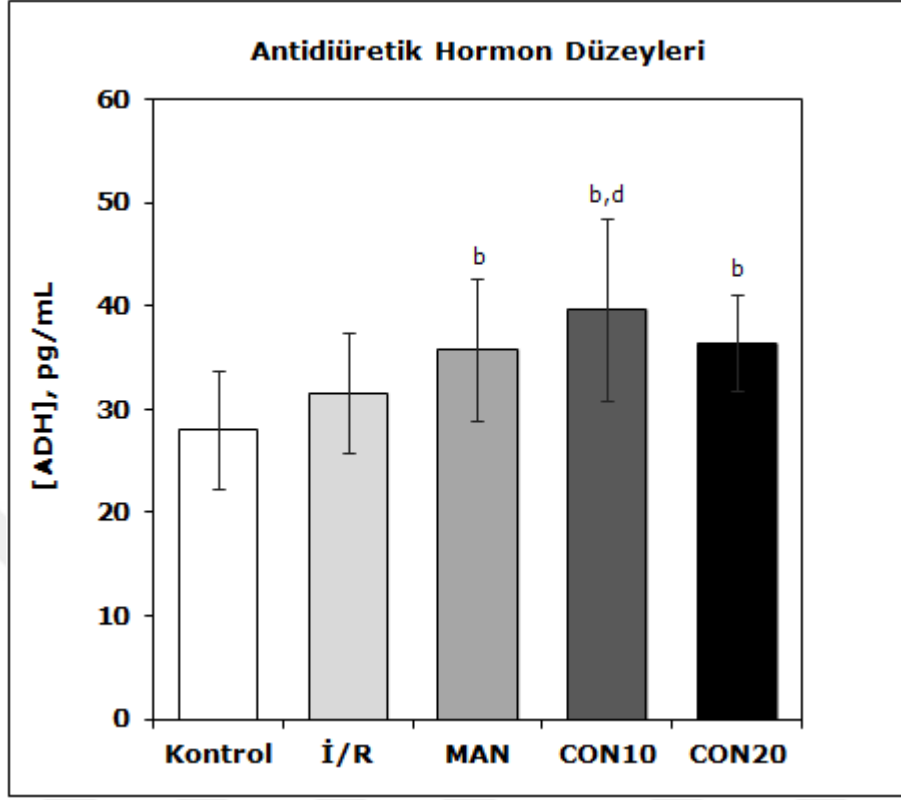
Deney gruplarının serum ADH düzeyleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Serum ADH düzeyleri (pg/mL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|---------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 28,07±5,73 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 31,53±5,81 |
| Mannitol | 12 | 35,82±6,82 ^b |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 39,67±8,76 ^{b,d} |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 36,40±4,65 ^b |

b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p<0,001);
d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı artış (p<0,001)

Serum ADH düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, Kontrol grubuna göre MAN ve her iki Conivaptan tedavi gruplarında anlamlı artış görüldü (p=0,001). En yüksek ortalama değer CON10 tedavi grubuna ait olup, bu artışın İ/R grubuna göre anlamlı olduğu tespit edildi (p=0,001).



Şekil 4.4. Serum ADH düzeylerine ait Histogram grafiği. b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$); d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,001$).

4.1.5. Nöron Spesifik Enolaz Düzeyleri

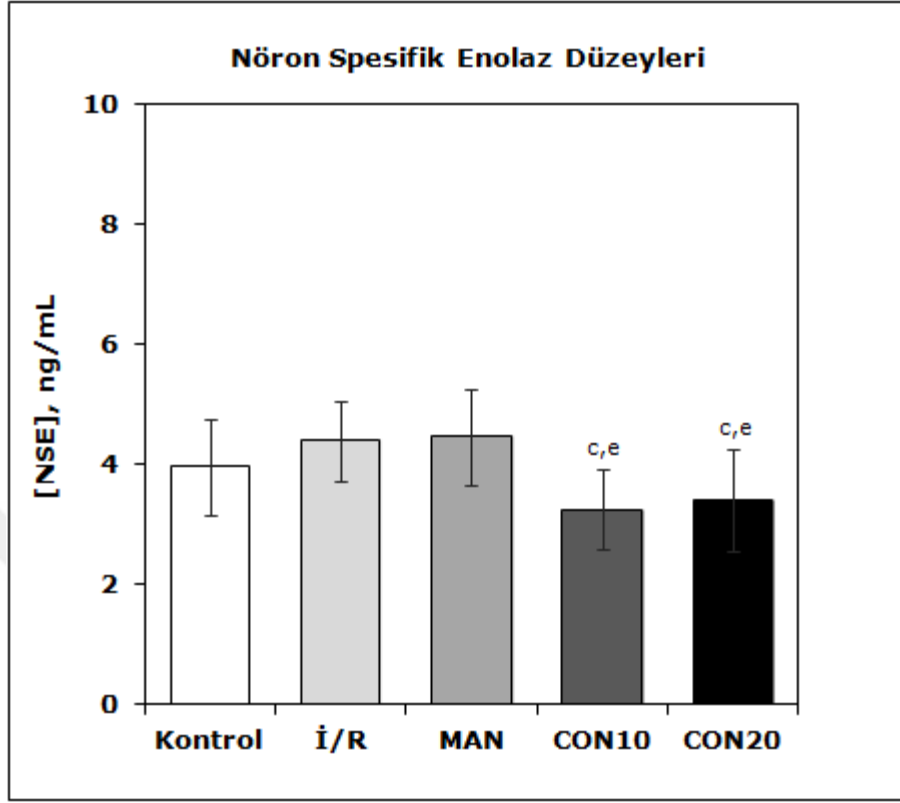
Deney gruplarının serum NSE düzeyleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Serum NSE düzeyleri (ng/mL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|--------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 3,96±0,80 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 4,39±0,68 |
| Mannitol | 12 | 4,45±0,80 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 3,25±0,67 ^{c,e} |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 3,41±0,86 ^{c,e} |

c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$);
e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$)

Serum NSE düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, her iki CON tedavi grubunda da, İ/R ve MAN grubuna göre anlamlı düzeyde azalma görüldü ($p<0,001$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, NSE düzeyleri İ/R ve MAN grubunda artış, Conivaptan gruplarında ise azalma gösterdi, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. En yüksek NSE ortalamasının MAN grubuna ait olduğu görüldü.



Şekil 4.5. Serum NSE düzeylerine ait Histogram grafiği. c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$); e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$).

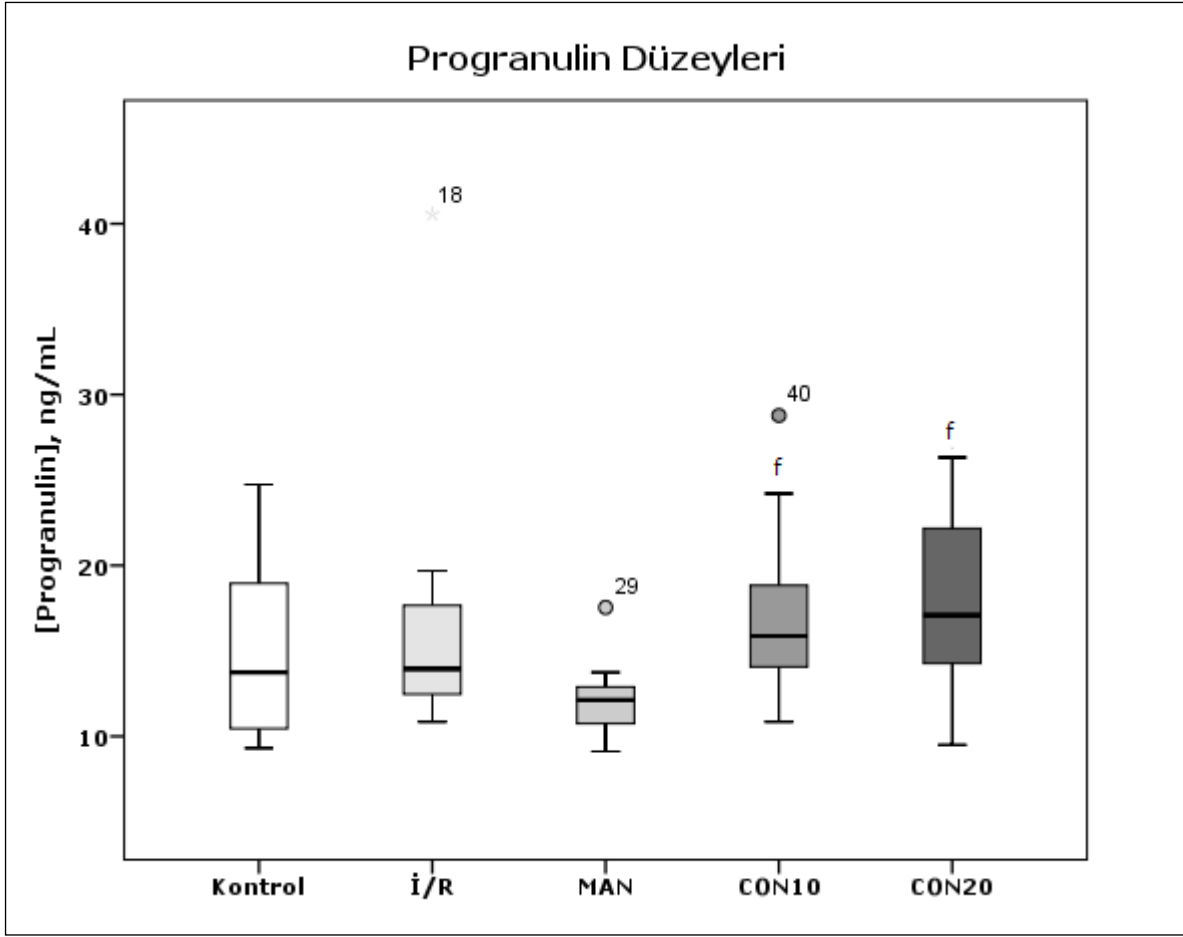
4.1.6. Progranulin Düzeyleri

Deney gruplarının serum Progranulin düzeyleri Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Serum Progranulin düzeyleri (ng/mL)

| Gruplar | n | Medyan (%25-%75) |
|---|----------|----------------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 13,74 (10,41-19,26) |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 13,95 (12,47-18,25) |
| Mannitol | 12 | 12,13 (10,70-13,21) |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 15,87 (13,90-18,90) ^f |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 17,08 (14,22-22,41) ^f |
| f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış (p<0,01) | | |

Serum Progranulin düzeylerinin istatistiksel analizlerinde, düzeylerinin ölçümlerine ait verilerin istatistiksel analizleri yapıldığında, CON10 ve CON20 gruplarında MAN grubuna göre anlamlı düzeyde artış görüldü (p<0,01). MAN grubu progranulin düzeyi İ/R grubuna göre azaldı, ancak anlamlı kabul edilmedi (p>0,05).



Şekil 4.6. Serum Progranulin düzeylerine ait Kutu grafiği. f, Mannitol grubuna göre anlamlı artış ($p < 0,01$).

4.1.7. TNF- α Düzeyleri

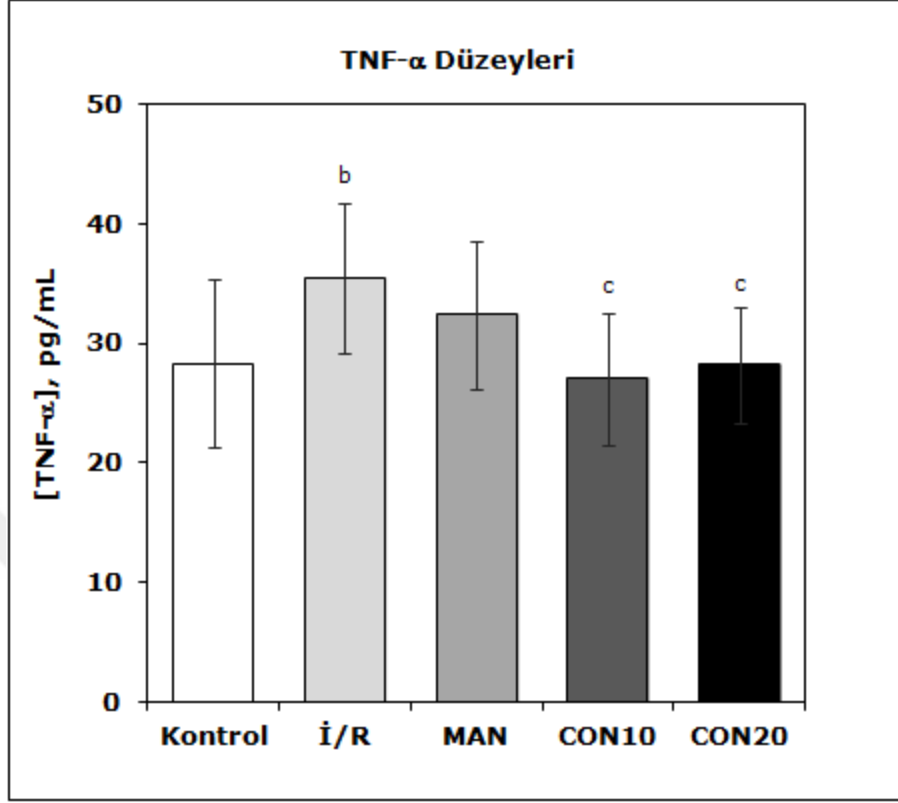
Deney gruplarının serum TNF- α düzeyleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Serum TNF- α düzeyleri (pg/mL)

| Gruplar | n | Ortalama \pm Standart Sapma |
|------------------------|----|-------------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 28,33 \pm 7,01 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 35,45 \pm 6,31 ^b |
| Mannitol | 12 | 32,38 \pm 6,18 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 27,05 \pm 5,54 ^c |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 28,22 \pm 4,88 ^c |

b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0,001);
c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma (p=0,001)

Yapılan istatistiksel analizler, İ/R grubunda TNF- α düzeylerinin Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artarken (p=0,001), CON10 ve CON20 tedavi gruplarında, İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azalma gösterdiğini ortaya koydu (p=0,001).



Şekil 4.7. Serum TNF- α düzeylerine ait Histogram grafiği. b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p=0,001$); c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p=0,001$).

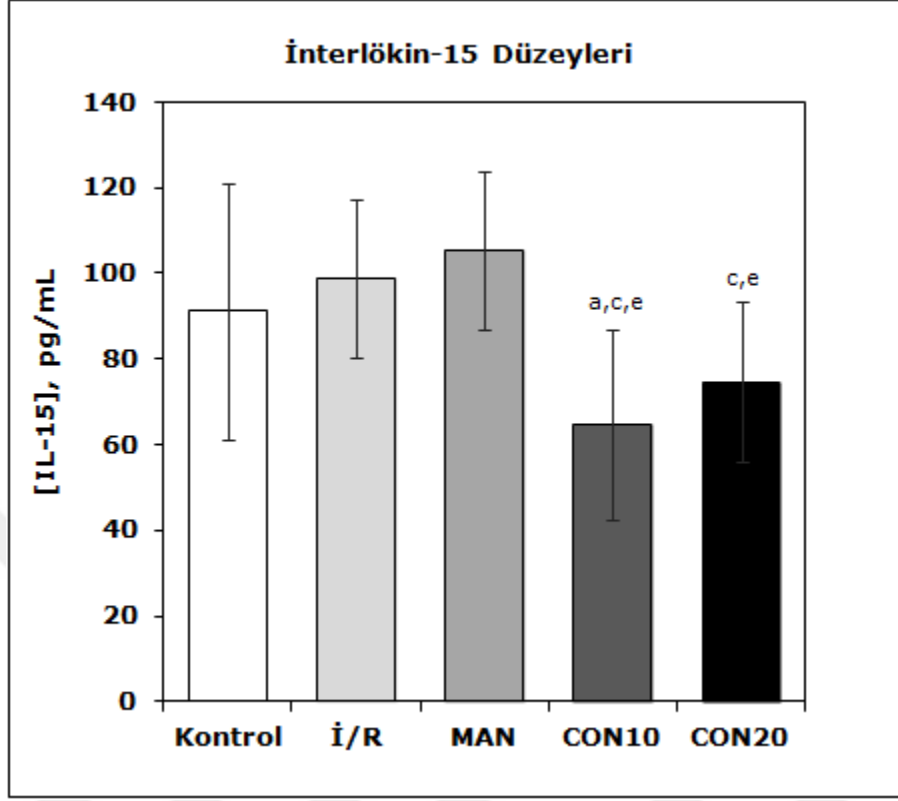
4.1.8. İnterlökin-15 Düzeyleri

Deney gruplarının serum IL-15 düzeyleri 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10. Serum IL-15 düzeyleri (pg/mL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|--|----|------------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 91,20±29,85 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 98,73±18,32 |
| Mannitol | 12 | 105,20±18,53 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 64,72±22,28 ^{a,c,e} |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 74,62±18,77 ^{c,e} |
| a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001); c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001); e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,001) | | |

Yapılan istatistiksel analizlerde, Kontrol ile karşılaştırıldığında IL-15 düzeylerinin, İ/R ve Mannitol grubunda arttığı, Conivaptan gruplarında ise azaldığı tespit edildi. Bu değişiklikler Kontrol'e göre CON10 grubu (p<0,001); İ/R grubuna göre her iki Conivaptan tedavi grupları (p<0,001) ve Mannitol grubuna göre yine Conivaptan tedavi grupları arasında anlamlıydı (p<0,001). İ/R grubunda Kontrol ile karşılaştırıldığında gözlenen artış anlamlı değildi (p>0,05).



Şekil 4.8. Serum IL-15 düzeylerine ait Histogram grafiği. a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$); c, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$); e, Mannitol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$).

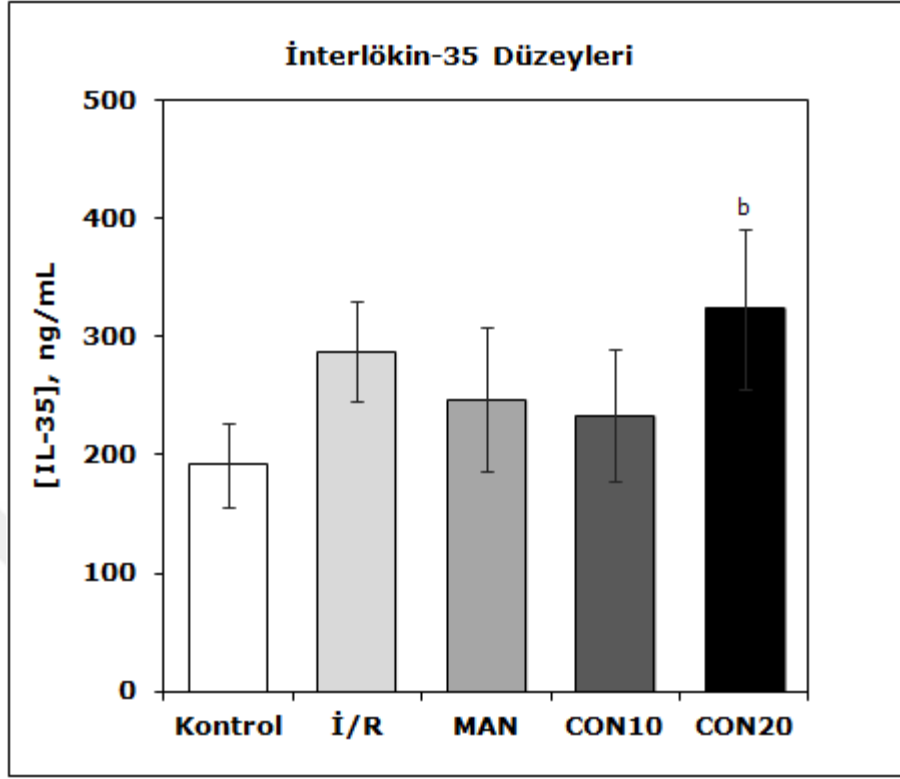
4.1.9. İnterlökin-35 Düzeyleri

Deney gruplarının serum IL-35 düzeyleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. Serum IL-35 düzeyleri (ng/mL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|--|----|---------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 191,67±35,72 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 287,65±42,68 |
| Mannitol | 12 | 247,05±60,72 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 233,67±56,34 |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 323,73±67,94 ^b |
| b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0,001); | | |

Yapılan istatistiksel analizlerde, Kontrol grubuna göre tüm gruplarda IL-35 düzeylerinde artış görüldü. Ancak bu artış yalnızca Kontrol ile CON20 grubu arasında anlamlılık gösterdi (p<0,001).



Şekil 4.9. Serum IL-35 düzeylerine ait Histogram grafiği. b, Kontrol grubuna göre anlamlı artış (p=0,001).

4.1.10. Miyeloperoksidaz Aktivitesi

Deney gruplarının serum MPO aktivitesine ait bulgular Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Serum MPO aktiviteleri (U/mL)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|------------------------|----|-------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 0,7545±0,3008 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 0,8205±0,6548 |
| Mannitol | 12 | 0,5595±0,3870 |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 0,4573±0,2781 |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 0,7179±0,6766 |

Yapılan istatistiksel analizlerde, MPO aktivitesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Ancak MPO aktivitesinin İ/R grubunda arttığı, diğer tüm gruplarda azaldığı gözlemlendi.

4.2. Doku Örnekleri Bulguları

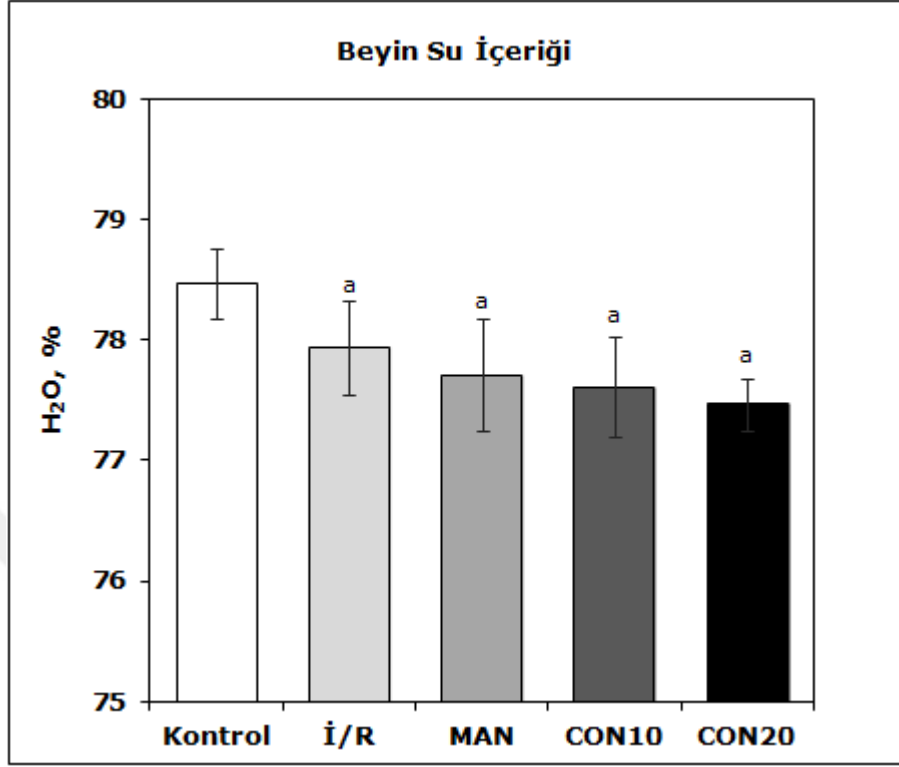
4.2.1. Beyin Ödemi

Doku örneklerindeki beyin su içeriğine ait bulgular Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. Beyin su içeriği (% H₂O)

| Gruplar | n | Ortalama±Standart Sapma |
|--|----|-----------------------------|
| Kontrol (Cerrahi-Sham) | 10 | 78,4702±0,2908 |
| İskemi-Reperfüzyon | 11 | 77,9313±0,3904 ^a |
| Mannitol | 12 | 77,7104±0,4651 ^a |
| Conivaptan 10 mg/mL | 12 | 77,6132±0,4187 ^a |
| Conivaptan 20 mg/mL | 12 | 77,4651±0,2131 ^a |
| a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p<0,001$) | | |

Yapılan istatistiksel analizlerde, beyin su içeriği yüzdesinde Kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı düzeyde azalma gözlemlendi ($p=0,003$). Bunun dışında gruplar arasındaki beyin su içeriği yüzdesindeki farklılıklar anlamlı değildi ($p>0,05$).



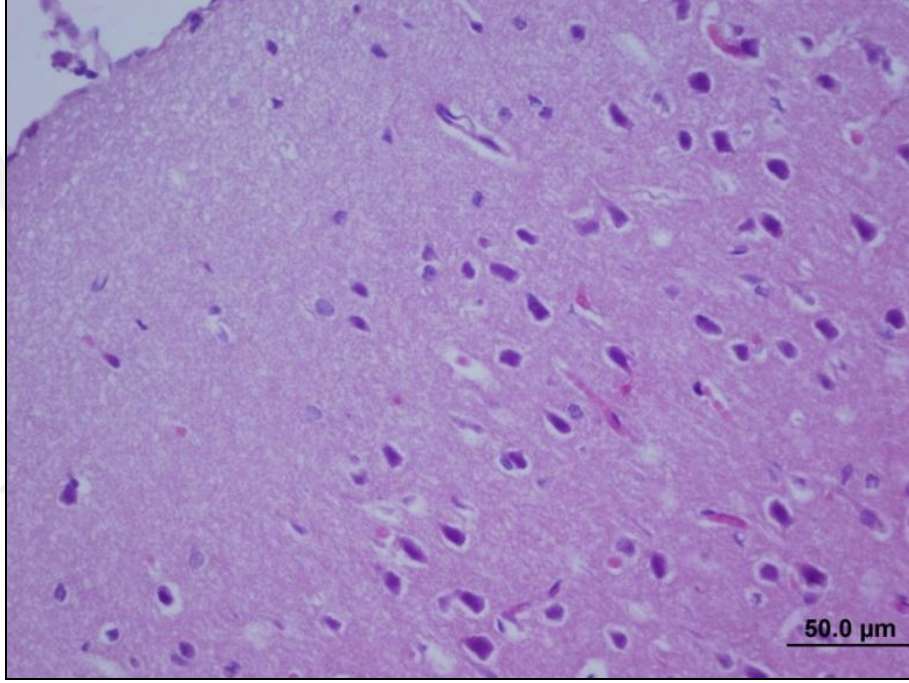
Şekil 4.10. Beyin su içeriğine ait Histogram grafiği. a, Kontrol grubuna göre anlamlı azalma ($p < 0,001$).

4.2.2. Histolojik İnceleme Bulguları

4.2.2.1. Hematoksilen-Eosin İncelemeleri

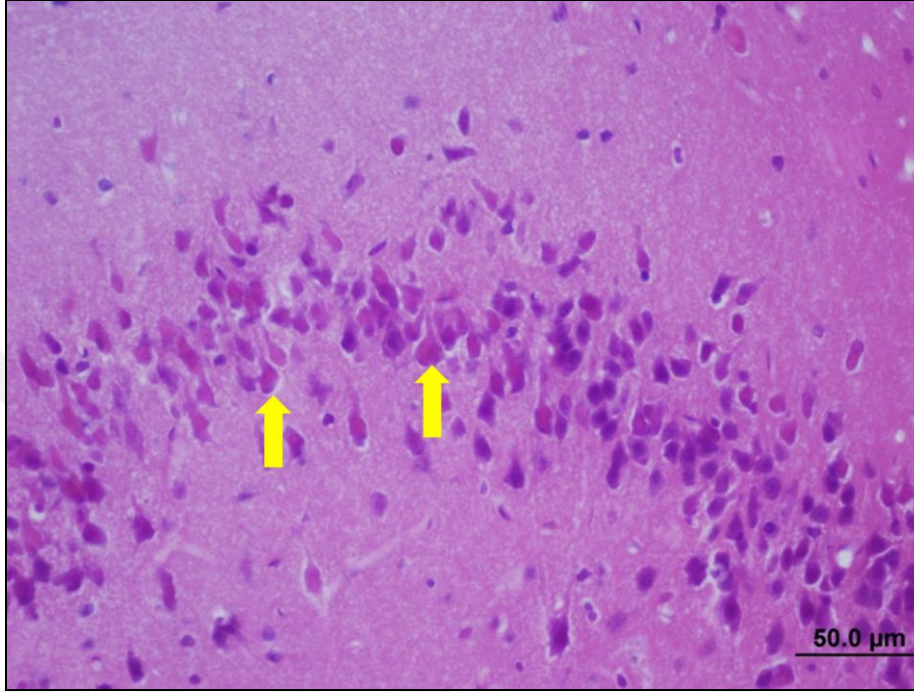
4.2.2.1.1. Frontal Korteks

Kontrol grubuna ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde histolojik yapının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).



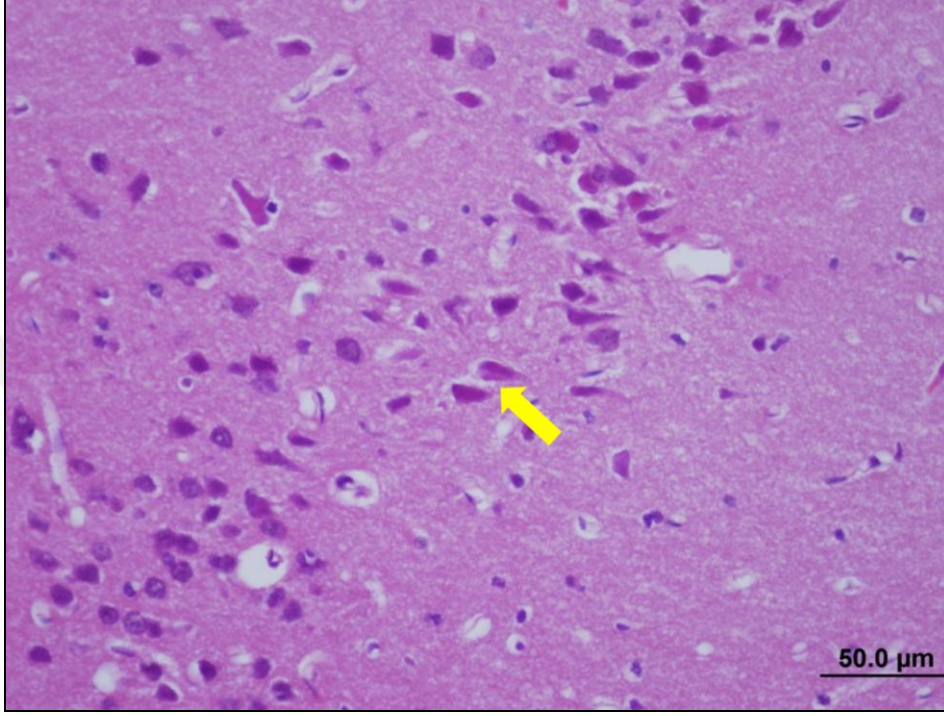
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Normal histolojik görünüm (HE, bar 50 µm).

İskemi-Reperfüzyon grubuna ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde, beyin korteks bölgesinde ödemli alanlara rastlandı. Bir kısım nöronların dejenerasyona uğradığı gözlemlendi (Şekil 4.12).



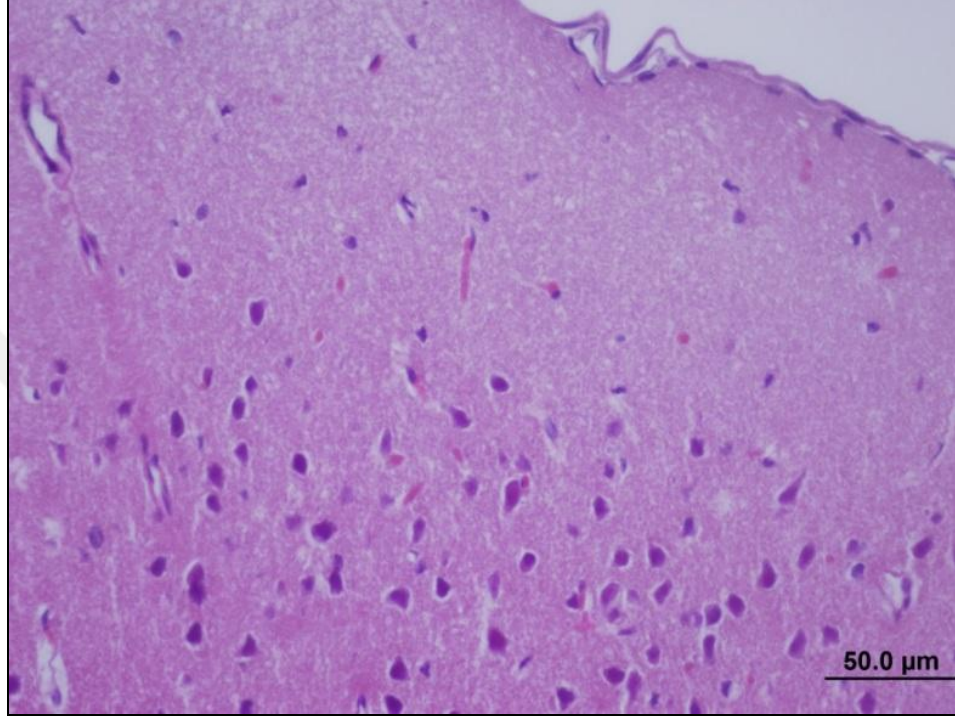
Şekil 4.12. İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Dejenerasyona uğramış asidofilik sitoplazmalı nöronlar (*oklar*). (HE, bar 50 µm).

Mannitol infüzyonu gerçekleştirilen gruba ait beyin frontal lob kesitleri incelendiğinde, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre, ödemli alanlara ve hasar gören nöronlara daha az rastlandı (Şekil 4.13).



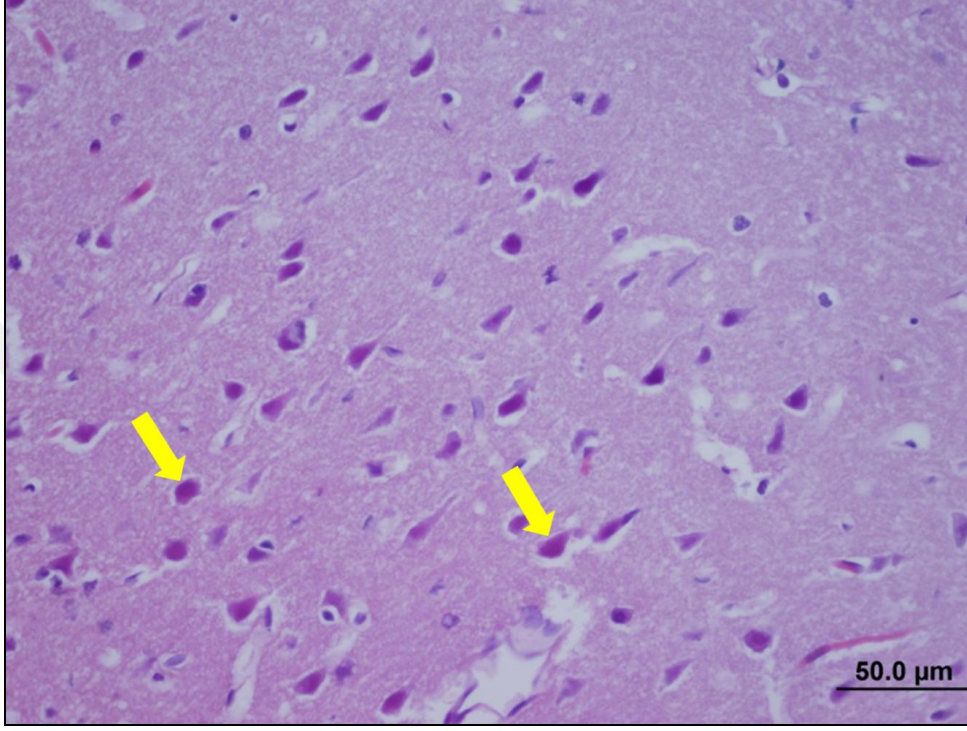
Şekil 4.13. Mannitol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Az sayıdaki, dejenerasyona uğramış asidofilik sitoplazmalı nöronlar (*oklar*). (HE, bar 50 µm).

10 mg/mL Conivaptan infüzyonu gerçekleştirilen gruba ait beyin frontal korteksi kesitlerinde, ödem ve nöron hasarına çok az rastlandı. Beyin histolojisi genel olarak kontroldekine yakındı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 10 mg/ml Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Normal histolojik görünüme sahip nöronlar, (HE, bar 50 µm).

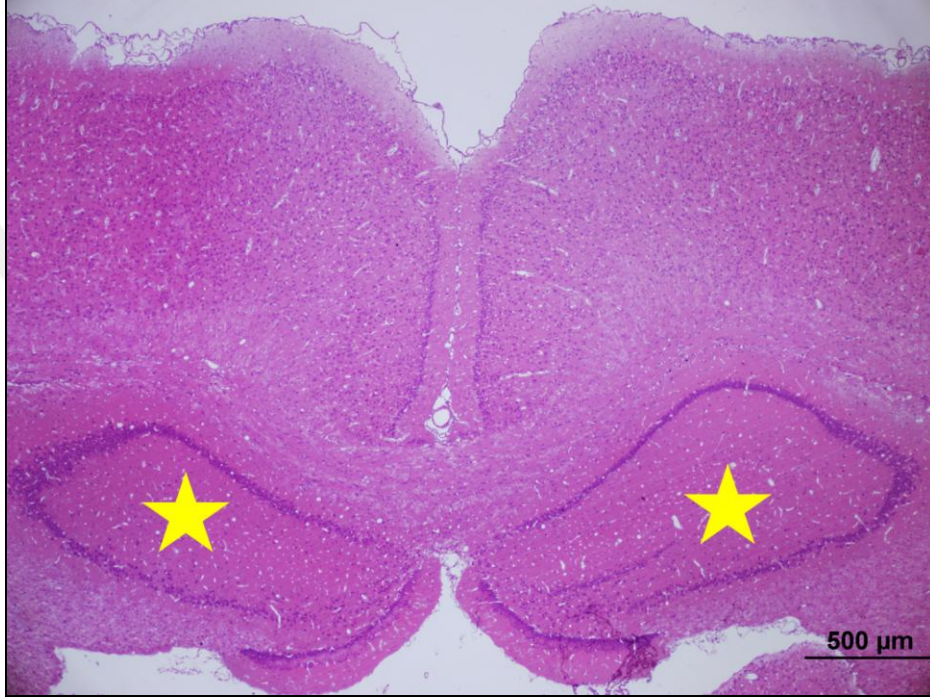
20 mg/mL Conivaptan infüzyonu gerçekleştirilen gruba ait beyin frontal korteks kesitlerinde ödem ve nöron hasarına rastlandı. Ancak, hasar çok yaygın değildi (Şekil 4.15).



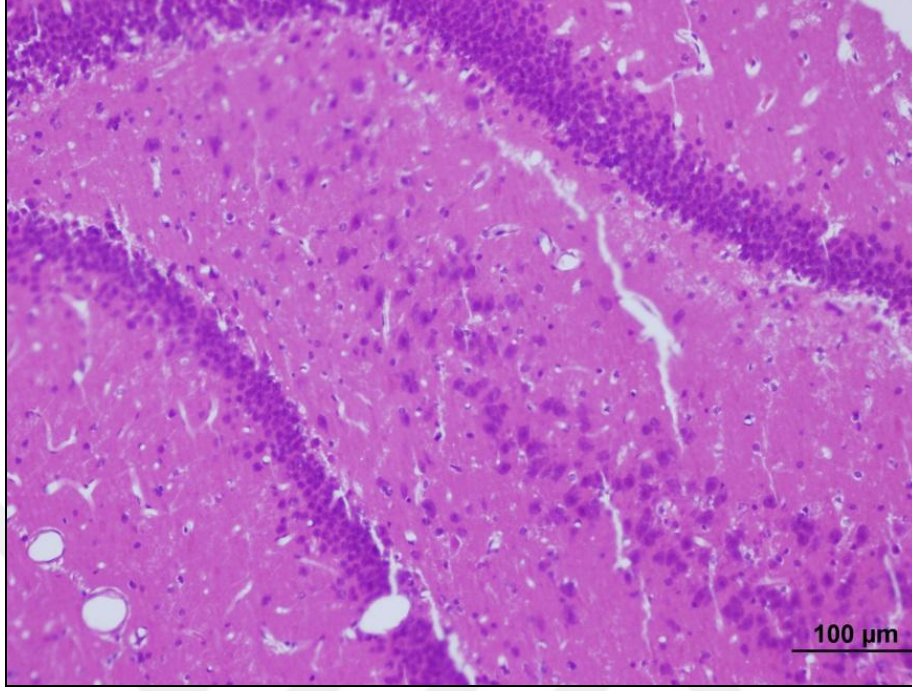
Şekil 4.15. 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi örneklerinin ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Az sayıdaki, dejenerasyona uğramış asidofilik sitoplazmalı nöronlar (*oklar*), (HE, bar 50 µm).

4.2.2.1.2. Hipokampüs

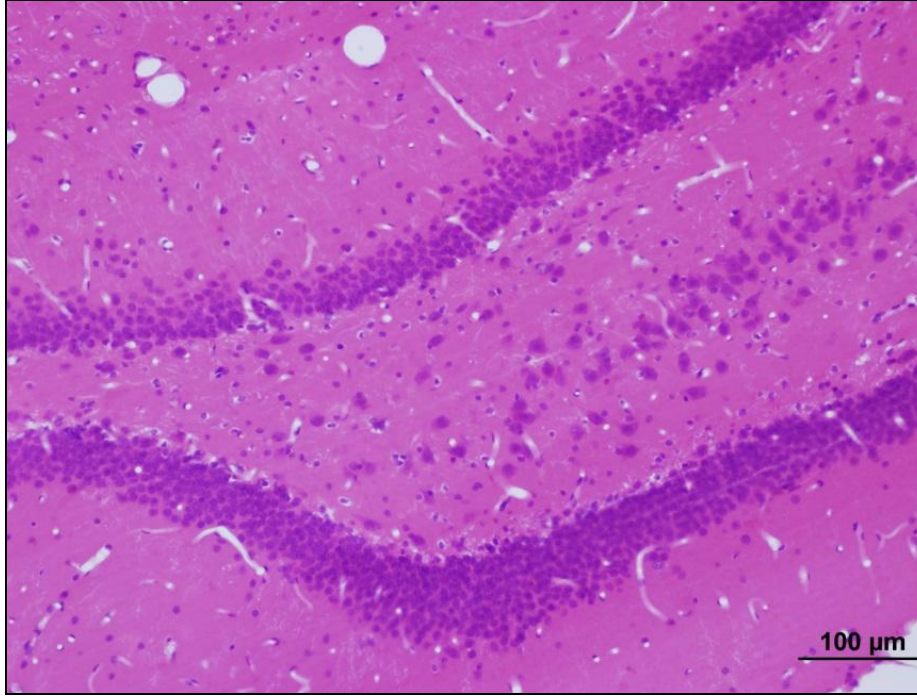
Tüm deney gruplarına ait beyin hipokampüs kesitlerinin Hematoksilen-Eosin incelemesinde, histolojik yapının normal olduğu gözlemlendi ve ödem, inflamasyon veya nöron hasarına rastlanmadı. Gruplar arasında beyin hipokampüs bölgesi histolojisinde farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.16-21).



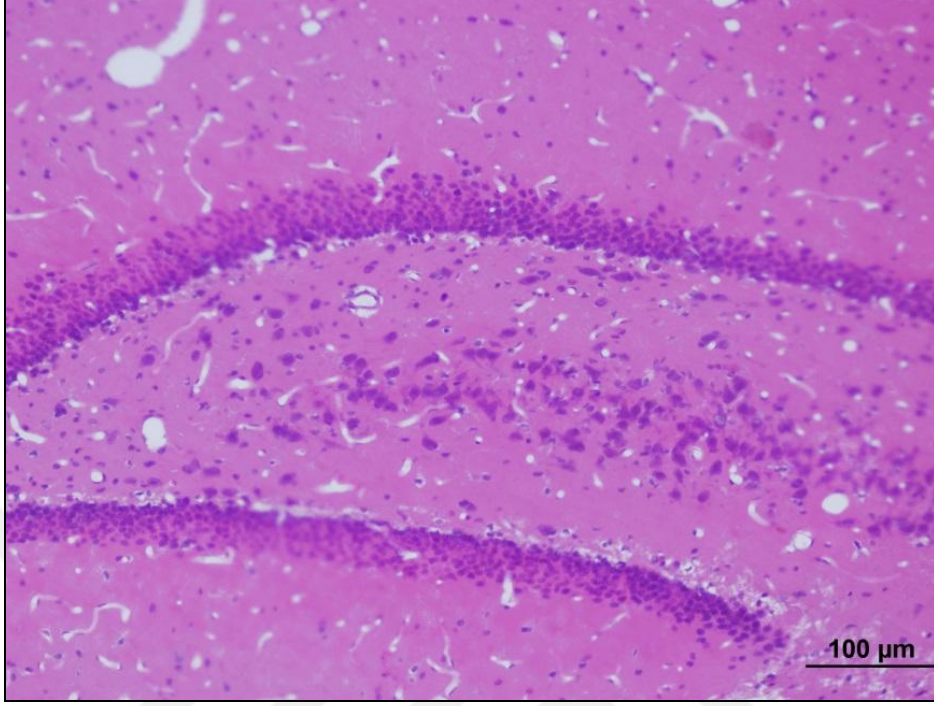
Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait sıçan beyin kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Her iki hemisfere ait hipokampüs bölgeleri (*yıldızlar*), (HE, bar 500 µm).



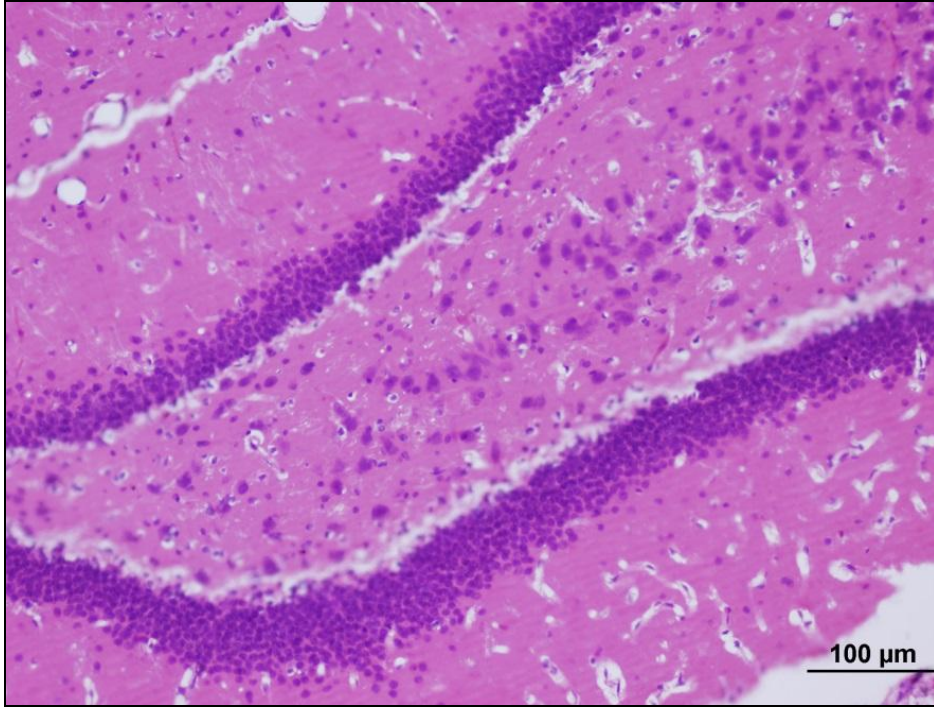
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait sıçan beyin hipokampus kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Nöronları içeren normal histolojik görünüm (HE, bar 100 µm).



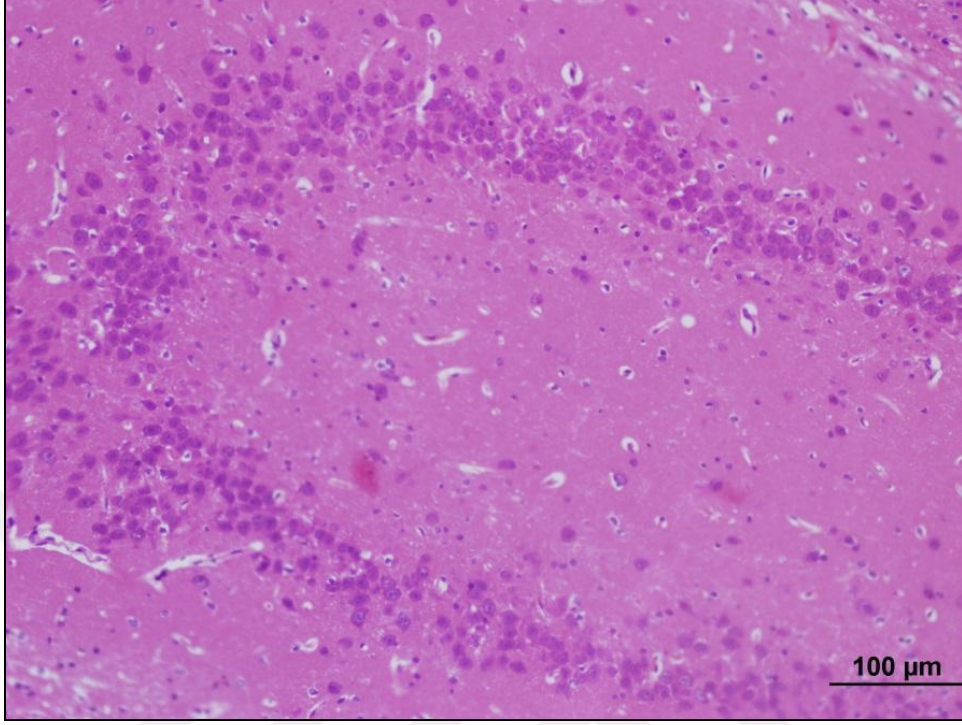
Şekil 4.18. İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan beyin hipokampus kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Nöronları içeren normal histolojik görünüm (HE, bar 100 µm).



Şekil 4.19. Mannitol grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Nöronları içeren normal histolojik görünüm (HE, bar 100 µm).



Şekil 4.20. 10 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Nöronları içeren normal histolojik görünüm (HE, bar 100 µm).

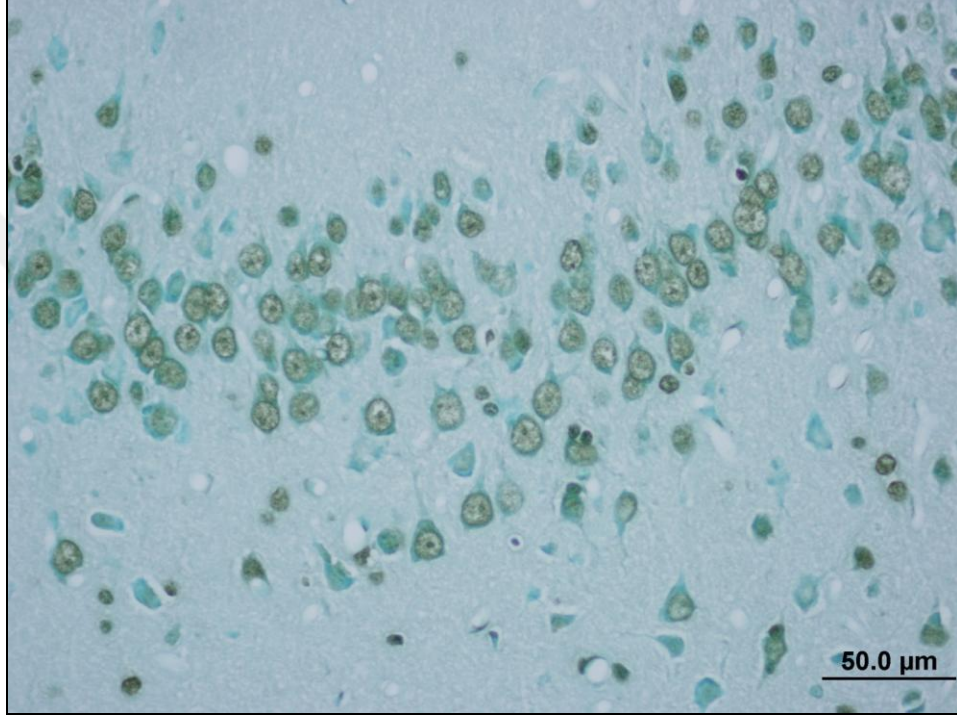


Şekil 4.21. 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. Nöronları içeren normal histolojik görünüm (HE, bar 100 µm).

4.2.2.2. TUNEL İncelemeleri

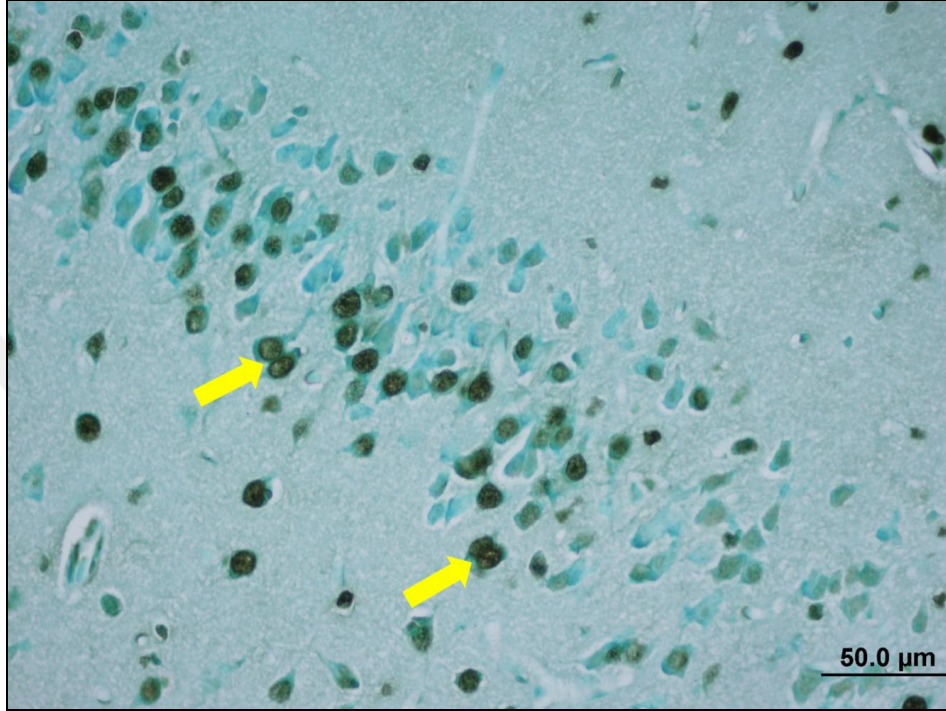
4.2.2.2.1. Frontal Korteks

Kontrol grubuna ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde, nöronlarda apoptozun olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.22).



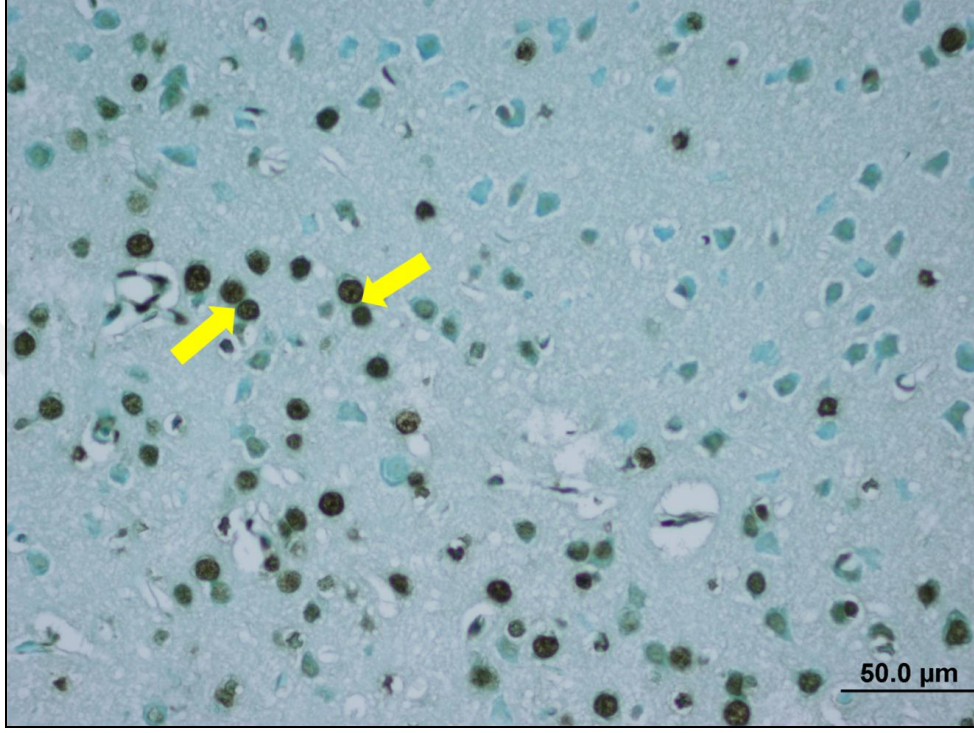
Şekil 4.22. Kontrol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile negatif boyanan ve apoptoz göstermeyen nöronlar. (bar 50 µm).

İskemi-Reperfüzyon grubuna ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde apoptoza uğrayan çok sayıda nöron varlığı gözlemlendi (Şekil 4.23).



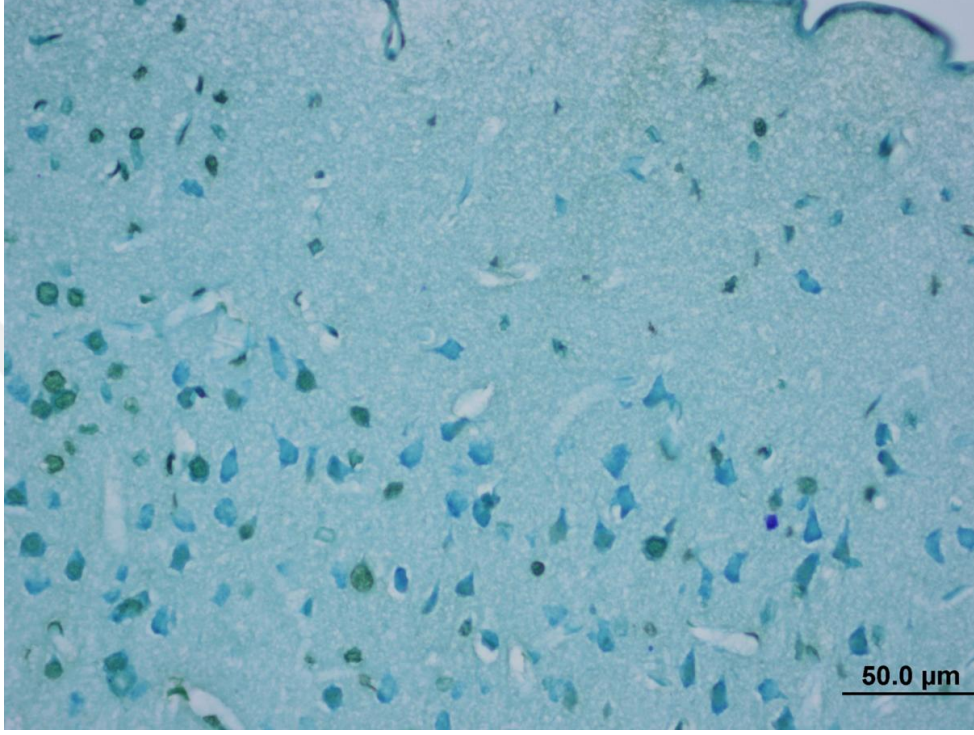
Şekil 4.23. İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile pozitif boyanan ve apoptoz gösteren çok sayıda nöronlar (*oklar*). (bar 50 µm).

Mannitol infüzyonu gerçekleştirilen gruba ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde apoptoza uğrayan az sayıda nöron varlığı gözlemlendi (Şekil 4.24).



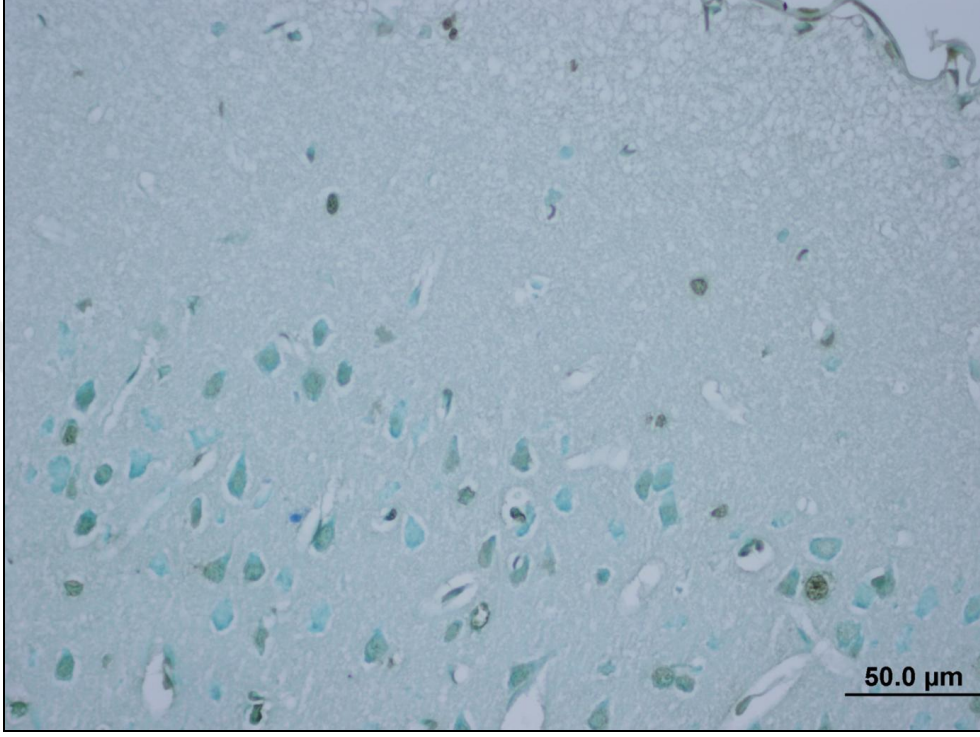
Şekil 4.24. Mannitol grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile pozitif boyanan ve apoptoz gösteren az sayıdaki nöronlar (*oklar*). (bar 50 µm).

10 mg/mL Conivaptan infüzyonu gerçekleştirilen gruba ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde nöronlarda apoptozun olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. 10 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile negatif boyanan ve apoptoz göstermeyen nöronlar. (bar 50 µm).

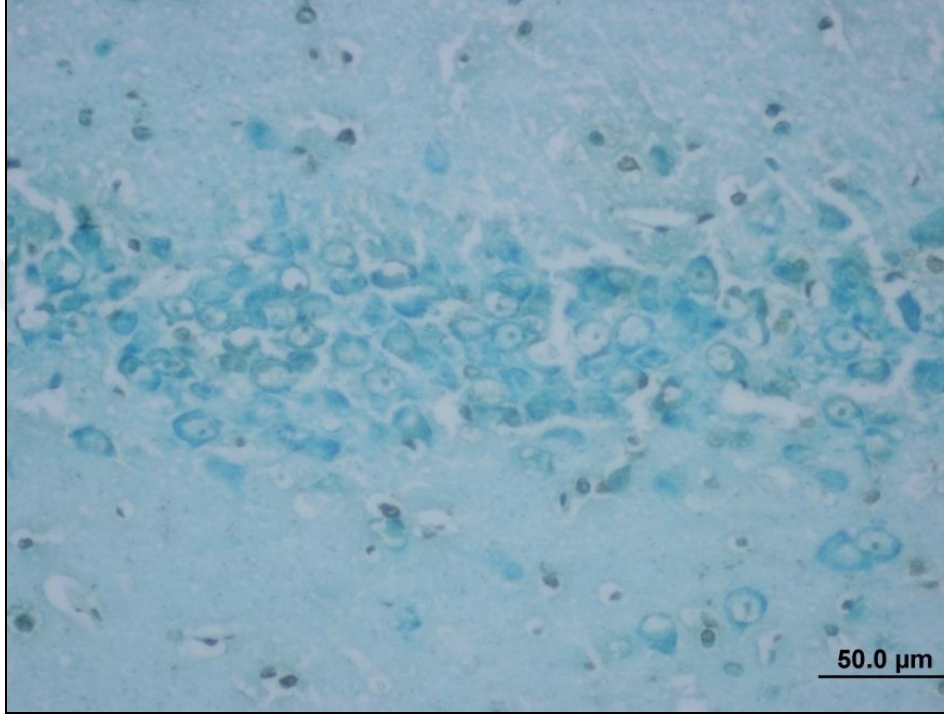
20 mg/mL Conivaptan infüzyonu gerçekleştirilen gruba beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde nöronlarda apoptozun olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. 20 mg/mL Conivaptan grubuna ait sıçan frontal beyin korteksi kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile negatif boyanan ve apoptoz göstermeyen nöronlar. (bar 50 µm).

4.2.2.2.2. Hipokampüs

Tüm deney gruplarına ait beyin hipokampüs kesitlerinin TUNEL incelemesinde, beyin hipokampüs bölgesi histolojisinde gruplar arasında nöron hasarı ve apoptoz açısından farklılık gözlenmedi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. İskemi-Reperfüzyon grubuna ait sıçan beyin hipokampüs kesitinde ışık mikroskobu ile inceleme görüntüleri. TUNEL ile negatif boyanan ve apoptoz göstermeyen nöronlar. (bar 50 µm).

Özetle, histopatolojik incelemede, gruplara ait beyin frontal kesitlerinin HE ve TUNEL boyama sonuçlarına göre, iskemi ve reperfüzyon uygulamasının nöronlarda dejenerasyona ve apoptoza yol açtığı, Mannitol veya Conivaptan infüzyonu ile nöron hasarı ve apoptozun azaldığı saptandı. En az nöron hasarı ve apoptoza 10 mg/mL Conivaptan uygulanan grupta rastlanırken, Mannitol'ün nöron koruyucu etkisinin daha sınırlı olduğu görüldü.

Tablo 4.14. Çalışma Verilerinin Özeti

| ÖLÇÜMLER | GRUPLAR | | | | | p Değerleri |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| | Kontrol (Sham) (Ort±Std.S/Medyan) | İskemi Reperfüzyon | Mannitol (%20) | Conivaptan (10 mg/mL) | Conivaptan (20 mg/mL) | |
| Na (mmol/L) | 145,60±2,55 | ↓↓ ^a | ↓ ^d | ↑↑ ^{d,f} | ↑ ^{d,f} | p<0,001* |
| K (mmol/L) | 6,40 (6,04-7,45) | ↑↑ | ↑ | ↓ | ↑↑↑ | ns** |
| Cl (mmol/L) | 103,31±2,40 | ↓ ^a | ↓↓ | ↑↑ ^{b,d,f} | ↑ ^{b,d,f} | p<0,001* |
| Albumin (mg/dL) | 3,72±0,18 | ↓↓ | ↓ | ↑ | ↑↑ | ns* |
| Ozmolalite (mmol/kg) | 345,55±20,58 | ↑ | ↓ ^c | ↑↑ ^f | ↓↓ ^{c,e,g} | p<0,001* |
| ADH (pg/mL) | 28,07±5,73 | ↑ | ↑↑ ^b | ↑↑↑↑ ^{b,d} | ↑↑↑ ^b | p=0,001* |
| Progranulin (ng/mL) | 13,74 (10,41-19,26) | ↑ | ↓ | ↑↑ ^f | ↑↑↑ ^f | p<0,01** |
| TNF-α (pg/mL) | 28,33±7,01 | ↑↑ ^b | ↑ | ↓↓ ^c | ↓ ^c | p=0,001* |
| İnterlökin-15 (pg/mL) | 91,20±29,85 | ↑ | ↑↑ | ↓↓ ^{a,c,e} | ↓ ^{c,e} | p<0,001* |
| İnterlökin-35 (ng/mL) | 191,67±35,72 | ↑↑↑ | ↑↑ | ↑ | ↑↑↑↑ ^b | p<0,001* |
| NSE (ng/mL) | 3,96±0,80 | ↑ | ↑↑ | ↓↓ ^{c,e} | ↓ ^{c,e} | p<0,001* |
| MPO (U/mL) | 0,76±0,30 | ↑ | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓ | ns* |
| Beyin Su İçeriği (%) | 78,47±0,29 | ↓ ^a | ↓↓ ^a | ↓↓↓ ^a | ↓↓↓↓ ^a | p<0,01* |

* Tek Yönlü Varyans Analizi

** Kruskal-Wallis Tek Yönlü Sıralamalı Varyans Analizi

ns, İstatistiksel açıdan anlamlılık olmayan

↑, Kontrol grubuna göre artma; ↓, Kontrol grubuna göre azalma

a/b, Kontrol grubuna göre; c/d, İskemi-Reperfüzyon grubuna göre; e/f, Mannitol grubuna göre; g/h, Conivaptan 10 mg/mL grubuna göre ve i/j, Conivaptan 20 mg/mL grubuna göre anlamlı azalma/artış.

5- TARTIŞMA

Beyin ödemi oluşumu iskemik inme, travmatik beyin hasarı, rüptüre serebral anevrizma ve neoplazi gibi çeşitli nörolojik koşullarda yaygın bir durumdur. Kafatasının sabit olan hacmi ve şişmenin sekonder nöronal hasar üzerine etkisi göz önüne alındığında, intraselüler ve ekstraselüler hacimdeki değişimler, bölgesel veya global serebral kan akışını ve hücre metabolizmasını tehlikeye atabilir; hayati beyin yapılarının sıkışmasına neden olarak kritik sonuçlar doğurabilir (Walcott, Kahle & Simard, 2012).

Tıbbi tedavi algoritmalarının bir parçası olarak uygulanan ozmoterapi, beyin hasarını takiben oluşan serebral ödemin ve artan İKB'nin klinik yönetiminin temel dayanağı olarak kabul görmektedir (Bhardwaj, 2007). Deneysel ve klinik araştırmalar sonucu elde edilen bulgular, çeşitli ozmotik ajanların serebral ödemi iyileştirmede ve bu süreçte artan İKB'nin kontrol altına alınabilmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Ancak ozmoterapi lehinde veya aleyhinde henüz herhangi bir fikir birliği sağlanamamıştır. Sonlanım üzerindeki etkilerini analiz eden güvenilir bilimsel çalışmaların yetersiz olması ve potansiyel olarak ciddi yan etkilerinin ortaya çıkabileceği gerekçesi ile beyin ödemi için ozmoterapinin rutin bir tedavi olarak kullanılmasının uygun olmadığı yönünde görüşler mevcuttur (Grande & Romner, 2012). Bu nedenle, nispeten iyi bir toksisite profiline sahip ideal bir ozmotik ajanın tespiti, uygun dozların/doz aralıklarının belirlenmesi, tedavi başlangıcının zamanlanması, optimal yarar süresinin saptanması ve uzun vadede sonlanım üzerindeki etkilerinin analizi için, daha ileri düzey araştırmalara olan ihtiyaç önemle vurgulanmaktadır (Walcott vd., 2012).

İskemik inmede akut/subakut komplikasyonlar arasında yer alan beyin ödeminin iyileştirilmesinde, Ulusal ve Uluslararası otoritelerce istenilen verimde etki gösterebilen ve yan etkileri minimal olan ideal bir anti-ödem ajan ile ilgili bilimsel veri ihtiyacından yola çıkılarak tasarlanan bu çalışmada, yeni bir akuaretik ajanın beyin ödemi sürecinde erken dönemdeki etkileri araştırıldı. Bu kapsamda inme ile ilişkili deneysel araştırmalarda, beyin ödemi oluşumunu sağlamak için sık kullanılan yöntemlerden biri olan Serebral İskemi-Reperfüzyon Modeli oluşturuldu. Reperfüzyon ile eşzamanlı olarak uygulanan intravenöz Mannitol ve Conivaptan tedavilerinin post-iskemik beyin hasarı, nöroinflamasyon ve beyin ödemi üzerine akut dönemdeki etkileri, yapılan bazı biyokimyasal analizler ve histolojik incelemeler yardımıyla karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda, akuaretik Conivaptan'ın, klinik uygulamalarda çeşitli kritik yan etkileri olduğu bildirilen diüretik Mannitol'e göre, daha olumlu etki ve niteliğe sahip olup olmama ihtimali üzerine değerlendirmeler yapıldı.

5.1. Serebral İskemi-Reperfüzyon Modeli

1970'li yılların sonlarından günümüze kadar, serebral doku hasarına neden olan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve inme ile ilişkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine temel oluşturulabilmesi amacıyla, çok sayıda serebral iskemi hayvan modeli geliştirilmiştir ve karakterize edilmiştir. Ancak insanlarda inmenin heterojenlik gösterebilmesi nedeniyle, yalnızca bir modelin tek başına inmeyi yansıtmakta yeterli olmadığı belirtilmektedir (Murphy, McCullough & Smith, 2004; Wang-Fischer & Koetzner, 2008).

Serebral iskemi hayvan modelleri arasında geçici ve/veya kalıcı fokal ve global modeller yer almaktadır. Deneysel inme ve ödem oluşumunu sağlamak için, her iki iskemi modeli de sık kullanılan yöntemler arasındadır. Fokal modellerin global olanlara göre insanlardaki inme ile daha yüksek düzeyde ilişkili olduğu belirtilmektedir (McBean & Kelly, 1998). Ancak fokal iskemide, lezyon bölgesinde kollateral dolaşım tarafından desteklenen kan akışının daha fazla olması ve bu nedenle infarkt oluşumu için daha uzun süre gerekebilmesi; etki süresi ve heterojenliği sebebiyle daha karmaşık olması gibi nedenlerle, global iskemiden önemli farklılıkları bulunmaktadır (Lipton, 1999). Bununla birlikte, geri dönüşümlü bir global iskemi modelinin, iyileşme sürecinde yapılan fizyolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel ölçümlerle nöroprotektif potansiyeli olan ajanların etki mekanizmalarının belirlenmesi ve elde edilen verilerin yorumlanmasında fokal modeller kadar yararlı olabileceği düşünülmektedir (McBean & Kelly, 1998). Bu çalışmada kolay uygulanabilir olması ve uygulanan tedavinin etkinliğini araştırmak için geri dönüşümlü bir hasar oluşturabilmesi amacıyla, global iskemi modeli kullanıldı.

Pulsinelli tarafından tanımlanan Dört Damar Oklüzyonu, global iskemi modelinin oluşturulması için en yaygın kullanılan modeldir (Pulsinelli & Brierley, 1979; Pulsinelli & Buchan, 1988). Vertebral arterlerin kalıcı olarak ve 24 saat sonra ise bilateral karotis arterlerin geçici olarak oklüzyonunun yapıldığı bu modelde, iki aşamalı bir cerrahi işlem gerçekleştirilmektedir. 1984 yılında geliştirilen İki Damar Oklüzyonu modelinde ise yalnızca bilateral karotis arterler klemplenmektedir, ilaveten hipotansiyon oluşturulmaktadır (Smith vd., 1984). Bu modelin dört damar oklüzyonu modeline göre, tek bir işlemde daha kolay uygulanabilir ve tamamen geri döndürülebilir olduğu, hipotansiyon tekniği ile desteklenerek serebral kan akışında daha tutarlı bir azalma ve önkoşullama etkisi sağlayabileceği belirtilmektedir (McBean & Kelly, 1998). İki damar oklüzyonu bu özellikleri nedeniyle, nöroprotektif ajanların değerlendirilmesi için bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Farbiszewski, Bielawski, Bielawska & Sobaniec, 1995; Li, Han, Ma & Qi, 2010). Bu çalışmada ise, uygulanan ajanların diüretik ve akuaretik özellikte olmaları, inflamatuvar belirteç düzeylerini etkileyebilecek ekstra enfeksiyon riski oluşturulmaması için cerrahi manipülasyonu minimumda tutma

gerekliliği ve vertebral arterlerin oklüzyon tekniğinin zorlukları gibi nedenlerle hipotansiyon ve vertebral arter oklüzyon işlemleri uygulanmadı; yalnızca bilateral karotisler klemplenerek iki-damar oklüzyonu gerçekleştirildi. Oluşturulan bu global modelde, iskemi süresi 30 dakika kadar nispeten uzun tutularak, beyin ödemi oluşma sürecinin kısaltılması hedeflendi. İskemi süresi sona erdikten sonra, klemplerin açılması ile reperfüzyon sağlandı.

Literatürde rekanalizasyon ve reperfüzyon terimleri genellikle birbirinin yerine kullanılmaktadır, ancak bunlar fizyolojik olarak farklı unsurlardır (Male, Nickele & Eljovich, 2016). Rekanalizasyon, tıkalı arterin açıklık düzeyini yeniden sağlayabilmek iken; reperfüzyon, doku sağ kalımı için önemli olan kapiller kan akışının akış yönünde restorasyonu ile tanımlanan, daha geniş kapsamlı bir kavramdır. İdeal olarak, reperfüzyon proksimal rekanalizasyon ile sağlanır, ancak komple rekanalizasyon, dokunun reperfüzyon yetersizliği nedeniyle akış yönünde büyük bir infarktüs ile sonuçsuz kalabilir. Buna karşın, bazı hastalarda rekanalizasyon minimaldir ya da olmayabilir, ancak doku reperfüzyonu, kollateral kan akışının artırılmasıyla sağlanır (Male vd., 2016). Akut iskemik inmede, beyin dokusunda oluşan hasarın şiddeti ve ödem oluşma riski, rekanalizasyonla birlikte reperfüzyon sürecinde daha da artmaktadır; bu durum kötü prognoz ile sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmada, oluşabilecek olası hasarı minimize etmek ve klinikte rekanalizasyon işlemi sırasında uygulandığında iyileşme üzerine etkilerini öngörebilmek amacıyla, infüzyon işlemleri reperfüzyon ile eşzamanlı olarak başlatıldı.

Sıçanlara uygulanacak ilaçlar gastrointestinal sistem (oral, gavaj vb.) ya da parenteral enjeksiyon (subkutan, intramusküler, intravenöz, intragastrik, intraperitoneal, intradermal, intranazal vb.) yoluyla verilebilmektedir. Yetişkin sıçanlarda intravenöz yolla verilebilen önerilen maksimum enjeksiyon hacminin 0.5-3 mL arasında olması ve enjeksiyon oranının 3 mL/dakika'yı aşmaması gerektiği belirtilmektedir (Wang-Fischer & McCool, 2009). Bu çalışmada, Conivaptan'ın intravenöz uygulanan bir ajan olması ve cerrahi prosedürde boyun kesisi yapıldığı için juguler vene kolay ulaşılabilir olması nedeniyle, tüm infüzyonlar juguler ven yoluyla ve hemodinamik instabiliteyi önlemek amacıyla 1 mL/saat hızla gerçekleştirildi.

İnfüzyon süresi tamamlandıktan sonra kesi bölgesi steril koşullarda suture ile dikilerek kapatıldı. İskemik hasar oluşumundan sonra hayvanlarda sağ kalımı sağlama zorluğu nedeniyle pek çok araştırmada olduğu gibi bu çalışmada da deney süresi kısa tutuldu (Betz, Keep, Beer & Ren, 1994; Menzies, Betz & Hoff, 1993). Reperfüzyondan 6 saat sonra, anestezi altında hayvanların kardiyak kan örnekleri ve beyin dokuları alındı. Alınan kan ve doku örneklerinde yapılan biyokimyasal hasar belirteçlerinin ölçümü ve histolojik incelemeler doğrultusunda, oluşturulan bu modelden beklenen başarının sağlanabildiği sonucuna ulaşıldı.

5.2. Elektrolit (Na⁺, K⁺, Cl⁻) Düzeyleri

Canlı hücrelerde intraselüler K⁺ konsantrasyonu yüksek ve Na⁺ konsantrasyonu düşüktür; ekstraselülerde ise bunun tam tersidir. Böylece, hücre içi K⁺ kaybı ve Na⁺ kazanımı için bir konsantrasyon gradyenti mevcuttur. Bu gradiyent, çeşitli iyonik kanalların ve transportörlerin aktivitesi aracılığıyla sürdürülmektedir, ancak Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesi baskın olmaktadır (Suhail, 2010). İskemi hasarından sonra, hücreler ATP yetersizliği nedeniyle bu iyon pompalarının sürekliliğini sağlayamaz ve hücrelerde Na⁺ iyonları birikir; ozmotik dengeyi sağlamak üzere su ve Cl⁻ iyonu da içeri yönde akar. Bunun tersine, ekstraselülerde ise K⁺ artışı meydana gelmektedir.

Akut iskemik inme ile gelen hastalarda sıvı-elektrolit denge bozukluğu önemli bir sorundur. Elektrolit denge bozuklukları arasında hiponatremi, hipernatremi ve hipokalemi yer almaktadır. Hipernatremi sık rastlanan bir durum değilken; hiponatremi özellikle, kullanılan ozmotik diüretik ilaçlar ya da primer dehidratasyondan kaynaklanmaktadır ve serebral ödem artışına neden olması bakımından önemli görülmektedir (Kumral, 2001). Ayrıca, yapılan bir araştırmada, iskemik beyindeki Na⁺ birikimine eşlik eden başlıca anyonun Cl⁻ olduğu, ancak beyindeki birikim hızının beyindeki hareket hızından çok daha düşük olması nedeniyle, hücre içine Cl⁻ alımının inhibisyonunun, beyin ödemi oluşumu üzerinde çok az etkisi olacağı düşünülmüştür (Betz vd., 1994).

Daha önceki çalışmalarda, iskemik süreçinde beyin dokusundaki su içeriğindeki değişimlerin, sodyum ve klorür konsantrasyonlarında doğrusal bir artış ve potasyum konsantrasyonunda ise azalma ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (Klatzo, 1987; Menzies vd., 1993; Betz vd., 1994). Astrositlerin Na⁺-K⁺-Cl⁻ ko-transportör aktivitesi nedeniyle MSS'de hücre içine K⁺ alımında önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Walz & Hertz, 1984). Kültüre edilmiş fare ve sıçan astrositlerinde, Na⁺-K⁺-Cl⁻ ko-transportör aktivitesinin yüksek ekstraselüler K⁺ düzeylerinde belirgin olarak uyarıldığı bildirilmiştir (Walz & Hertz, 1984). Bu nedenle, astrositler, sahip oldukları transportörlerin aktivasyonunu sağlayarak, iskemik beyinlerde K⁺ alımında önemli rol oynayabilir ve İSS homeostazını koruyabilir (Yan, Dempsey & Sun, 2001).

Sağlıklı yetişkin erkek sıçanlara ait serum Na⁺ düzeyleri 141.00-148.00 mEq/L, K⁺ düzeyleri 4.70-6.10 mEq/L ve Cl⁻ düzeyleri 100.00-105.00 mEq/L olarak bildirilmiştir (Giknis & Clifford, 2006). Çalışmamızda da benzer olarak Kontrol grubuna ait serum Na⁺, K⁺ ve Cl⁻ düzeyleri, sırasıyla, 145.60±2.55 mmol/L, 6.6580±0.8140 mmol/L ve 103.31±2.40 mmol/L olarak bulundu.

İ/R grubunda serum Na⁺ ve Cl⁻ düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (p<0,001). Bu durum daha önceki

çalışmalarda da ifade edildiği gibi, iskemi-reperfüzyon sürecinde Na^+ - K^+ -ATPaz aktivitesinin azalması nedeniyle hücre içine Na^+ alımı ve ozmotik dengeyi sağlamak üzere beraberinde Cl^- iyonlarını da sürüklemesinden kaynaklanabileceğini düşündürdü. Yapılan histolojik incelemelerde, İ/R grubunda özellikle frontal korteks bölgesinde ödematöz oluşumlara rastlanması, elektrolit düzeylerindeki bu değişikliklerin büyük olasılıkla, beyin dokusuna serbest su geçişlerini de artırdığını gösterdi.

MAN, CON10 ve CON20 gruplarında Na^+ düzeylerinde İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiği görüldü ($p < 0,001$). MAN grubundaki artış, diğerlerine göre daha azdı. Bu durum, Mannitol'ün diüretik etkisinden dolayı, renal elektrolit atılımını sağlamasından kaynaklanıyor olabilir. CON10 ve CON20 gruplarında MAN grubuna göre serum Na^+ ve Cl^- düzeylerindeki artışlar ($p < 0,001$), Conivaptan'ın akuaretik özelliği nedeniyle serbest suyun renal atılımını artırırken, elektrolitlerin vasküler tutulumunu sağlamış olabileceğini düşündürdü. Deney sürecinde özellikle CON10 grubundaki hayvanlarda diğer gruplara göre çok daha fazla idrar atılımının görülmesi; ölçülen en yüksek serum Na^+ ile Cl^- düzeylerinin bu grupta olması; yapılan histolojik incelemelerde, CON10 grubuna ait beyin frontal korteks kesitlerinde ödemin diğer gruplara göre çok daha az ve beyin histolojisinin nispeten kontrole yakın olması, bu yaklaşımı destekledi. Bu bulgular, Conivaptan'ın doza bağlı olarak, aynı süre ve koşullar altında uygulanan Mannitol'e göre, iskemi-reperfüzyon sürecinde daha etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürle uyumlu olarak (Molnar vd., 2008) çalışmamızda da gruplar arasında K^+ düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). Bu durum, K^+ düzeylerinin nispeten dengede kalmasında, KBB'deki astrositik uç ayakların homeostatik rolü olabileceğini düşündürdü. Çalışmamızda bunu kanıtlayabilecek ilave bir analiz yapılmadı. Beyin dokusu ve idrar örneklerinde elektrolit düzeylerinin ölçülmesi yararlı bilgiler sağlayabilir.

5.3. Serum Albümin

Kandaki küçük moleküllerin taşınmasında rol oynayan bir protein olan albümin, vasküler sistemden dokuya sızan sıvının kısıtlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Sutherland vd., 2012). Ayrıca plazma kolloid onkotik basıncını koruduğu ve farmakolojik dozlarda hemodilüsyonu indüklediği belirlenmiştir (Ginsberg, 2008).

Albüminin, endojen ve ekzojen oksidatif stres kaynaklarını antagonize eden, plazmanın temel antioksidanı olarak kabul edilmektedir ve bu güçlü antioksidan etkisinden özellikle üç mekanizma sorumlu tutulmaktadır (Halliwell, 1988); 1) Üzerinde reaktif sistein-34 tiyol yapısı içermesi; 2) Redoks-aktif geçiş metallerini, özellikle de bakır iyonlarını, bağlama yeteneği,

böylece bakır iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu ve yüksek düzeyde reaktif hidroksil radikal türlerinin oluşumunu inhibe edebilmesi (Halliwell, 1988) ve 3) hasar verici redoks reaksiyonlarına katılabilen yağ asidi gibi amfipatik gruplara bağlanabilmesi. Albüminin, antioksidan etkinliği sırasında hasar görebildiği, ancak plazmada çok miktarda bulunduğu için bu hasarın biyolojik olarak önemli olmadığı, proteolitik olarak yıkılarak hızlıca yenilenebileceği belirtilmektedir (Halliwell, 1988).

Albümin, çok yönlü olumlu etkilerinden dolayı nöroprotektif olabileceği ve bu etkisini beyin şişkinliğini azaltmak, suboklüziv mikrovasküler lezyonlara kan akışını arttırmak, damar açıklığını korumak ve başarılı bir tromboliz sonrasında yeniden oklüzyonu önlemek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleştirebileceği belirtilmektedir (Ginsberg, 2008). 2 saat süreyle orta serebral arter oklüzyonu yapılan bir çalışmada, orta doz albümin tedavisinin, nörolojik fonksiyonu belirgin şekilde iyileştirdiği ve infarkt hacmini (%84 kortekste, %61-66 totalde) ve beyin şişmesini azalttığı bildirilmiştir (Belayev, Liu, Zhao, Busto & Ginsberg, 2001).

Serum albümin, beslenme durumunun biyokimyasal belirteçlerinden biridir. Akut inme sonrası gelişebilen protein-enerji malnütrisyonunun kötü sonlanım için bir risk faktörü olduğu ve hücrel immunitiyi azaltarak prognozu kötüleştirebileceği gösterilmiştir (Davalos vd., 1996). Akut inmeli hastalarda yüksek serum albüminin, kötü sonlanım riskini azalttığı ve yapılan regresyon analizi sonucunda serum düzeylerinin inme sonlanımı için bağımsız bir prediktör olduğu bildirilmiştir (Dziedzic, Slowik & Szczudlik, 2004).

Albüminin, bozulan KBB ile ilişkili hastalıklarda, beyin ödeminin oluşumu ve ödemin akışı üzerine ozmotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, albümin içeriğinin, MCA oklüzyonundan 1 ve 3 saat sonra iskemik kortekste non-iskemik kortekse göre az miktarda artış gösterdiği ve beyin albümin içeriğinin 3 gün boyunca ilerleyerek artmaya devam ettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada albüminin dokudan temizlenmesinin, ödem ile karşılaştırıldığında, en az 1 hafta geç kaldığı tespit edilmiştir (Menzies vd., 1993). Bu araştırma sonucunda, ödemin miktarının büyük çoğunluğunun dokuda albümin birikmeye başlamadan önceki ilk 6 saat içinde gelişmesi; KBB bozularak albümin beyne girdiğinde ödem oluşumunun hızlanmaması; MCAO'dan sonra 3 gün boyunca albüminin dokuda birikmeye devam etmesi ve ödem miktarının 12 saat ile 3 gün arasındaki süre boyunca sabit kalması, gibi bulgular doğrultusunda, albüminin iskemik ödem oluşumunda rol oynamadığı sonucuna varılmıştır (Menzies vd., 1993).

Sağlıklı 3-7 haftalık erkek sıçanlarda serum albümin düzeyleri 3.20-4.70 g/dL olarak belirtilmiştir (Giknis & Clifford, 2006). Bu çalışmada ise benzer şekilde, Kontrol grubu serum albümin $3,72 \pm 0,18$ g/dL olarak ölçüldü.

Gruplar arasında serum albümini istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Ancak serum albümin ortalamaları karşılaştırıldığında, en düşük değer İ/R grubunda görüldü ($3,58\pm0,28$ g/dl). Bu durumun nedeni, iskemi-reperfüzyon sürecinde vasküler yapının zarar görerek kraniyal ve ekstrakraniyal dokulara plazmadan albümin kaçırları ya da süreçte oluşan oksidan moleküller nedeniyle hasar gören albüminlerin degradasyonu olabilir.

Her ne kadar gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmese de, yüksek serum albmin ortalamalarının Conivaptan gruplarında görülmesi dikkat çekiciydi. Mannitol'ün Conivaptan kadar etkili olmadığı görüldü. Albümin'in antioksidan ve nöroprotektif özelliği düşünülduğünde, Conivaptan tedavisinin, albümin artışını sağlayarak sonlanım üzerine olumlu yönde etki gösterebileceği değerlendirilebilir. Bu doğrultuda albümin takibinin ve İskemi-Modifiye albümin ölçümlerinin yapılabilmesi, faydalı bilgiler sağlayabilir, ancak çalışma kapsamında bu analizler yapılmadı.

5.4. Serum Ozmolalitesi

Sağlıklı bireylerde serum ozmolalitesi nispeten sabittir (280-290 mOsm/L) ve Na^+ konsantrasyonu serum ozmolalitesinin temel belirleyicisidir (Bhardwaj, 2007). Glukoz, sodyum ve kan üre azotu (BUN) düzeylerinin serum ozmolalitesinin belirleyici faktörleri arasında yer aldığı belirtilmektedir (Ock vd., 2016). Özellikle nöroloji ve akut yoğun bakım ünitesi hastalarının çoğunda, hipozmolaliteli dilüsyonel hiponatremi gelişebilmektedir. Bu durum, inme geçiren hastalar için serebral ödemi ilerleterek hayati tehlike oluşturmaktadır (Fofi vd., 2012; Joynt, Feibel & Sladek, 1981).

Yüksek glukoz seviyelerinin serum ozmolalitesinde artışa neden olduğu belirtilmektedir. Akut iskemik inme hastalarında yapılan bir araştırmada, hiperozmolalite ve hiperglisemi arasındaki ilişkinin sonlanım üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hiperglisemi yokluğunda, hiperozmolalitenin kötü sonlanımla ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Ock vd., 2016).

Son yıllarda yapılan araştırmalar birçok böbrek dışı dokunun, hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde önemli etkileri bulunabilen hiperozmotik stres yaşadığına dair kanıtlar sağlamaktadır ve ayrıca hiperozmotik stresin pro-inflamatuvar sitokin salınımını ve inflamasyonu tetikleyen güçlü bir inflamatuvar uyarıcı olduğunu göstermektedir (Brocker, Thompson & Vasiliou, 2012). Hiperozmotik stres, akut ve kronik, bunun yanı sıra lokal ve sistemik inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Hiperozmolaritenin hücrelerin büzülmesi, mitokondriyal depolarizasyon, oksidatif stres, protein karbonilasyonu, DNA hasarı ve hücre döngüsünün durmasını tetikleyerek, hücreleri apoptoza daha hassas hale getirmektedir.

Ancak hiperozmotik stresin zararlı etkilerine karşı birçok adaptif mekanizmanın mevcut olduğu belirtilmektedir (Brocker vd., 2012).

Çeşitli patolojik koşullar altında suyun oral alımındaki azalmanın, dehidrasyon ve yüksek ozmolalite ile sonuçlandığı ileri sürülmüştür (Bhalla vd., 2000). Hiperozmolalitenin, sınırlı oral su alımı koşulları altında ozmotik diürez ile ilişkili olarak intravasküler hacim deplesyonunu kötüleştirebileceği bildirilmiştir (Lang'dan aktaran Ock vd., 2016). Bu nedenle çalışmamızda, MAN ve CON tedavi gruplarındaki sıçanlara, reperfüzyon sürecinde dehidrate olmalarını önlemek amacıyla, infüzyon işlemleri tamamlandıktan sonra 1 mL intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

Bu çalışmada Kontrol grubu serum ozmolalitesi $345,55 \pm 20,58$ mmol/kg olarak ölçüldü. MAN ve CON20 gruplarında İ/R grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit edildi ($p < 0,001$). MAN grubunda Mannitolün diüretik etkisi sonucu elektrolit atılımına neden olması, dolayısıyla, ozmolalitedeki azalma, beklenen bir durumdu. CON10 grubu diğer gruplara kıyasla en yüksek ozmolaliteye sahipti ($376,13 \pm 41,61$ mmol/kg) ve MAN ve CON20 gruplarına göre anlamlı artış gösterdi ($p < 0,001$). CON10 grubuna ait Na^+ ve Cl^- düzeylerindeki değişiklikler ve yüksek ADH düzeyleri, ozmolalite artışına katkı sağlamış olabileceğini düşündürdü.

CON20 grubunda gözlenen en düşük ozmolalite ortalaması, MAN ve CON10 grubundaki hayvanlara kıyasla idrar miktarındaki göze çarpan azalma, bu grupta renal yetmezlik gelişmiş olabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu yaklaşımı destekleyen ilave analizlere ihtiyaç vardır.

5.5. Antidiüretik Hormon Düzeyleri

En önemli fonksiyonu su homeostazını korumak olan ADH'nin global serebral iskemi (Molnar vd., 2008; Ikeda, Toda, Kawamoto & Teramoto, 1997), travmatik beyin hasarı (Trabold, Krieg, Scholler & Plesnila, 2008), subaraknoid hemoraji (Doczi, Laszlo, Szerdahelyi & Joo, 1984), intraserebral hemoraji (Rosenberg, Scremin, Estrada & Kyner, 1992) ve iskemik inme (Joynt vd., 1981) gibi beyin hasarı üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda önemli rol oynadığına dair bulgular elde edilmiştir.

Mongolian gerbillerde yapılan bir araştırmada, karotid oklüzyonu ile ilk 6 saat boyunca uyarılan iskemik inmenin, fokal kortekste ADH düzeylerini arttırdığı ve korteks spesifik ağırlığını (ödem) (prefrontal lob, parietal lob, temporal lob, oksipital lob ve hipokampus) azalttığı; korteks ödemi ile lokal ADH seviyeleri arasında negatif ilişki bulunduğu; non-iskemik kortekste ise spesifik ağırlıklar ve ADH konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik

meydana gelmeyip, ADH'in ve reseptör antagonistinin ödeme neden olmadığı ortaya konulmuştur (Zhao vd., 2015b).

Son yıllarda, özellikle yeni geliştirilen non-peptid ajanlarla yapılan ADH antagonizması çalışmaları ön plandadır. Yapılan bir çalışmada (Molnar vd., 2008) sıçanlarda, bilateral ana karotis arter ligasyonu ile genel serebral hipoksi oluşturulmuştur. Karotis ligasyonunun beyin su, Na⁺ içeriği ve plazma ADH düzeyini artırdığı, K⁺ düzeylerinin ise değişmediği bildirilmiştir. Ligasyonu takiben, bir non-peptid ADH V₂ reseptör antagonisti (OPC-31260) 30 mg/kg dozda intragastrik yolla uygulandığında, beyin su içeriğindeki artışın ve Na⁺ birikiminin önlendiği, plazma ADH düzeylerinin daha da arttığı ve sağ kalımda olumlu yönde etkiler gösterdiği görülmüştür. Ayrıca serebral kortikal kapillerin elektron mikroskobu ile yapılan histolojik incelemelerinde, karotis oklüzyonundan 6 saat sonra KBB hasarının göstergesi olarak vakuolizasyonlar, vasküler astrositik uç-ayaklarda ve nöronal mitokondrilerde şişmeler meydana geldiği görülmüştür. Ancak V₂ reseptör antagonistinin KBB hasarına istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi olmadığı ifade edilmiştir.

1 saat süreyle orta serebral arter oklüzyonu yapılan farelerde, reperfüzyon başlangıcıyla birlikte özellikle 0.2 mg/gün dozda intravenöz uygulanan Conivaptan ile V_{1A} ve V₂ reseptörleri birlikte bloke edildiğinde nörolojik bozuklukların iyileştiği, beyin su içeriğinin azaldığı, plazmada Na⁺ konsantrasyonunda ve ozmolalitesinde artış ve idrarda ise düşüş tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, bir V₂ reseptör antagonisti olan Tolvaptan'ın oral tedavisinde ise Conivaptan'da gözlenen iyileştirici yönde etkiler görülmediği bildirilmiştir (Zeynalov vd., 2015).

Sıçanlarda ADH sekresyonunun düzenlenmesinde kan ozmolalitesi ve hacminin rolünü araştıran bir çalışmada, kısa süreli sıvı yoksunluğu gibi olağan bir fizyolojik durumda, ADH sekresyonuna yönelik en önemli uyarıcının, kan ozmolalitesinde ortaya çıkan artış olduğu düşünülmektedir (Dunn, Brennan, Nelson & Robertson, 1973). Aynı çalışmada, 12 saatlik sıvı kısıtlamasından sonra sıçanlarda gözlenen kan hacminde % 2'lik bir düşüşün, tek başına plazmada ADH düzeyinde gözlemlenen artışa neden olamayacağı, ozmolalitede % 1.5 artışın bu etkiye sahip olabileceği ileri sürülmektedir. Daha uzun süreli sıvı kısıtlaması sırasında, kan hacmindeki ilerleyen düşüşün ADH sekresyonunun korunmasında önemli olabileceği belirtilmektedir. Plazma ADH-ozmolalite ilişkisinde azalmanın, uzun süreli sıvı kısıtlamasının ardından gözlenmemesi, eşlik eden hipovolemi ile ozmotik yolla ilişkili ADH sekresyonunun güçlendiğini gösterir.

Konjestif kalp yetmezliğinde ADH'in rolünü araştıran bir çalışmada, sol koroner arterin oklüzyonu ile indüklenen miyokard infarktüs sıçan modeli oluşturulmuştur. Kalp yetmezliği olan farelerde ADH düzeylerinde küçük ama

istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Cerrahi sham ve kalp yetmezliği olan farelere, 0.3-3 mg/kg doz aralığında tek doz oral yolla verilen Conivaptan'ın, doza bağımlı olarak, üriner elektrolit (Na^+ , K^+ , Cl^-) atılımı üzerinde önemli etkiler göstermeksizin, idrar ozmolalitesinde düşüş ve idrar hacminde ise yaklaşık 10 kat artışı indüklediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, ADH'nin V_{1A} reseptörleri aracılığıyla vasküler tonusun yükseltilmesinde ve V_2 reseptörleri aracılığıyla ise serbest su tutulumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Wada vd., 2002).

Yüksek düzeydeki ADH vazospazm, trombosit agregasyonu, su retansiyonu, dilüsyonel hiponatremi ve düşük plazma ozmolalitesine yol açarak, inme sürecinde gelişen beyin ödemi daha da artırabilmektedir (Jia vd., 2016; Thibonnier vd., 2001). Hormon karaciğer ve böbrekte hızlıca metabolize olur; dolaşımdaki yarılanma ömrü yaklaşık 15-20 dakika kadardır (Costello-Boerrigter & Boerrigter, 2009).

Sıçanlarda plazma ozmolalitesindeki her %1'lik artış ile birlikte ADH düzeyinin de 2-4 kat arttığı belirtilmektedir (Dunn vd., 1973). Ancak bulgularımız, ADH düzeyi ile ozmolalite artışının paralel gidişini desteklememektedir. ADH'nin yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle, reperfüzyondan 6 saat sonra yapılan ölçümler bu ilişkiyi ortaya koyamama nedenimiz olabilir. ADH yerine yıkım ürünlerinin ölçümü, kan dolaşımında nispeten daha uzun süre kalabilmeleri sebebiyle, daha yararlı bilgiler sağlayabilir.

İ/R grubunda serum ADH düzeyleri Kontrol grubuna göre arttı, ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). MAN ve her iki Conivaptan tedavi grubunda serum ADH düzeyleri, Kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdi ($p = 0,001$). Bu sonuç muhtemelen, Mannitol'ün sıvı atılımı etkisi nedeniyle, su tutulumunun uyarılması olarak düşünülebilir. CON10 ve CON20 gruplarında gözlenen ADH artışı ise beklenen bir durumdu. Bu durumun nedeni Conivaptan'ın her iki ADH reseptörüne antagonizm özelliğinin olması, bu nedenle ADH'lerin reseptörüne bağlanamaması, akuaretik etki sonucu su atılımının devamı ve bunun daha fazla ADH salınımını uyarması olabilir. En yüksek ADH düzeyinin CON10 tedavi grubuna ait olması, uygulanan bu dozun CON20 grubuna göre daha etkili olduğunu düşündürdü.

5.6. Nöron Spesifik Enolaz Düzeyleri

Yapılan klinik araştırmalarda, periferel dolaşımda bulunmaları beyin dokusundaki ve BOS'taki hasar sonrası dinamikleri yansıtan, beyne spesifik prospektif pek çok biyobelirteç olduğu tespit edilmiştir; bu biyobelirteçlerin birçoğu iskemik inme ve intrakraniyal hemorajide bağımsız diagnostik ve prognostik öneme sahiptir (Glushakova, Glushakov, Miller, Valadka & Hayes,

2016). Bu önemli klinik biyobelirteçlerden biri de NSE'dir. NSE'nin BOS ve kana salınması ile nöron hasarı ve KBB bütünlüğünün bozulmasının tespit edilebileceği belirtilmektedir (Tiainen, Roine, Pettila & Takkunen, 2003). Ancak inme fenotiplerinin heterojenliği nedeniyle, yararlı klinik bilgilerin uygun bir biyobelirteç paneli yardımıyla sağlanabileceği vurgulanmaktadır (Glushakova vd., 2016).

Çeşitli beyin hastalıkları arasında özellikle inme ve inme ile ilgili pre-klinik çalışmalarda, BOS ve kan örneklerindeki NSE konsantrasyonlarının yüksek olduğu belirtilmektedir (Zaheer vd., 2013). Akut iskemik inmeli hastalarda, 1. günde NSE düzeyleri ile 3. gündeki infarkt hacmi ve 30. günde fonksiyonel nörolojik sonlanım arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle serum NSE düzeylerinin takibinin, fonksiyonel nörolojik sonlanım için prediktif açıdan yararlı olabileceği ileri sürülmektedir (Zaheer vd., 2013; Oh vd., 2003). Akut iskemik inme hastalarında yapılan bir diğer çalışmada ise, semptom başlangıcından sonraki ikinci günde plazma örneklerinde NSE düzeylerinin tepe değerine ulaştığı görülmüştür; NSE düzeylerinin infarkt hacimleri ile korelasyon gösterdiği ($r=0.37$, $P<0.05$), ancak klinik sonlanımla ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Missler, Wiesmann, Friedrich & Kaps, 1997).

Bir diğer çalışmada sıçanlarda MCAO işlemi uygulanarak NSE'deki serebral immünohistolojik ve plazma değişikliklerinin 2 saat ile 15 gün arasında değerlendirilmiştir ve oklüzyondan 1-2 gün sonra infarktüs bölgelerinde nöronlardan hücre dışı alana NSE-immünofloresans kaybı gözlemlenmiştir (Barone vd., 1993). Ayrıca MCAO'yu takiben, plazmada NSE'nin kontrol grubuna göre, 2 saatten başlayan ve 2.5 gün süreyle devam eden istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, MCAO kaynaklı kortikal infarktüsün ve nörolojik disfonksiyonun, beyinde NSE'nin nöronal deplesyonu ve vasküler dağılımı ile ilişkili olduğu ve böylece plazmada NSE artışına neden olduğu belirtilmiştir. İskemik dokudan NSE'nin serebrovasküler sisteme ve genel dolaşıma bu şekilde difüzyonunun, akut ve kronik iskemik beyin infarktüsünde serebral hasar insidansının bir belirteci olarak görülebileceği ileri sürülmüştür.

NSE'nin eritrositlerde ve trombositlerde de bulunduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar hatalı yüksek NSE değerlerinden kaçınmak için, görünür hemolizli numunelerin analizini önermemektedir (Tiainen vd., 2003). Trombositlerde NSE beyin dokusunda gözlemlenenden 30 kat daha az olsa da, serebral fokal iskemiye takiben trombosit değişikliklerinin kandaki NSE'nin düzeylerine katkıda bulunması olası görülmektedir (Barone vd., 1993). Çalışmamızda serum örneklerimizde görünür bir hemolize rastlanmadı.

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, % 20'lik 5 mL/kg'lık dozda mannitol (1098 mozmol/L) internal karotis arterden 0.12 mL/sn'lik bir hızla uygulanmıştır. BOS'ta ölçülen NSE konsantrasyonlarının, KBB'nin mannitol ile ozmotik olarak açılmasından etkilenmediği bildirilmiştir. KBB'nin ozmotik yolla açılmasının miyelin degradasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kozler, Sobek & Pokorny, 2015).

NSE ve KBB arasındaki bağlantıyı incelemek için, metotreksat infüzyonu yapılmadan önce intraarteriyel mannitol infüzyonuyla iyatrojenik KBB bozulmasına maruz kalan primer MSS lenfomalı iki hastanın serumunda, NSE düzeyleri ölçülmüştür. Mannitol infüzyonu sonrasında serum NSE düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir (Kapural vd., 2002). Çalışmamız bu bulgularla uyumluluk gösterdi. Mannitol infüzyonu NSE düzeylerinde İ/R grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşturmadı. İ/R ve MAN grubunda NSE düzeyleri yakındı, ancak MAN grubu en yüksek NSE düzeylerine sahipti. İstatistiksel açıdan MAN grubu ile İ/R arasında anlamlı fark görülmesi de, NSE'nin MAN grubunda artışının nedeninin, Mannitol'ün KBB'yi açabilme etkisi olabileceği düşünüldü. NSE artışını, Mannitol'ün beyin hasarını artırdığı yönünde yorumlamak doğruyu yansıtmayabilir. Bunun nedeni, MAN grubuna ait beyin frontal lob kesitleri histolojisinde, İ/R grubuna göre, ödemli alanlara ve hasar gören nöronlara daha az rastlanması olabilir.

CON10 ve CON20 gruplarında ise NSE düzeylerinde İ/R ve MAN grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit edildi ($p < 0,001$). Bunun yanı sıra histolojik bulgular, Conivaptanın hasar üzerinde Mannitole göre daha etkili olabileceğini gösterdi. Bu nedenle NSE düzeylerinin akut dönemde hasar patofizyolojisini yansıtabileceği ve Conivaptan'ın hasar gidişatını ve buna bağlı olarak nöronal NSE kayıplarını, Mannitole göre daha etkili olarak önleyebileceği veya yavaşlatabileceği düşünülebilir.

5.7. Progranulin Düzeyleri

Progranulin, çeşitli biyolojik fonksiyonları olan ve vücutta yaygın olarak ekspresye edilen bir proteindir. PGRN'nin nöroprotektif etkisinin incelendiği geniş kapsamlı bir çalışmada (Tao, Ji, Wang, Liu & Zhu, 2012), MCAO uygulanan wild-tip ve transgenik farelerde, post-iskemik nöronal hasar ve fonksiyonel bozukluklar test edilmiştir. Oklüzyonu takiben genel nörolojik fonksiyon ve motor aktivitenin wild-tip farelerde bozulduğu, fakat PGRN'nin aşırı ekspresyonu ile kısmen kurtarıldığı; transgenik farelerde ise daha hızlı ve daha büyük ölçüde bir iyileşme görüldüğü ve ayrıca korteks, striatum ve hipokampusta yapılan histolojik boyamalar ve hücre sayımlarının da bu bulguyu desteklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, PGRN'nin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkilerini incelemek üzere, bu farelerden alınan astrositler kültüre edilerek lipopolisakkarit ile muamele edilmiştir. Transgenik farelerin

glialarında TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonlarının wild-tip farelere göre önemli ölçüde azaldığı, ancak anti-inflamatuar özellikteki IL-10 sitokininin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, PGRN transgenik farelerden alınan gliaların, ölçülebilir apoptoz veya nekroz olmaksızın, LPS'de 7 gün boyunca hayatta kaldıkları, wild-tip fare glialarının ise % 23.3'ünün yedi gün içinde apoptotik olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, PGRN'nin anti-apoptotik ve anti-inflamatuar özelliklere sahip umut verici endojen bir nöroprotektan olduğu ve inmeli hastalarda post-iskemik immün sistem aracılı reaksiyonların önlenmesi için potansiyel bir aday olabileceği ileri sürülmüştür (Tao vd., 2012).

Post-iskemik PGRN ekspresyonundaki ve lokalizasyonundaki temporal değişiklikleri; ayrıca PGRN'nin *in vitro* ve *in vivo* modellerle iskemik beyin hasarı üzerindeki terapötik etkilerini belirlemeyi amaçlayan bir diğer çalışmada, serebral iske mi için fokal embolik iske mi sıçan modeli oluşturulmuştur. Bu modelde, otolog trombüs yoluyla MCAO işlemi gerçekleştirilmiştir. İske mik çekirdek içindeki nöronlarda PGRN ekspresyonun azaldığı, iskemik penumbra da ise hayatta kalan nöronlarda, mikroglia ve endotel hücrelerinde ise arttığı gösterilmiştir. PGRN'nin, KBB yıkımını hafifletilmesi, nöroinflamasyonun baskılanması ve nöroproteksiyon gibi çeşitli mekanizmalarla akut fokal serebral iske miye karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca intravenöz olarak uygulanan rekombinant PGRN'nin serebral infarkt ve ödemi azalttığı, hemorajik transformasyonu baskıladığı ve motor sonlanımı iyileştirdiği bildirilmiştir (Kanazawa vd., 2015).

Literatürde iskemik penumbra da PGRN ekspresyonunun endotelial hücreler tarafından gerçekleşebildiği ve bu hücrelerin vasküler koruma sağlayabileceği bildirilen bir serebral iske mi çalışmasında (Kanazawa vd., 2015), PGRN'nin, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)'nün sinyal yolağını aktive eden moleküllerin mikroglial üretimini inhibe ederek, vasküler permeabiliteyi düzenleyebileceği ileri sürülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda, bu görüşü destekleyen bir analiz yapılmamıştır.

İ/R grubu PGRN düzeylerinin, Kontrol ve MAN gruplarından daha yüksek olduğu gözle ndi, ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). Literatürde, PGRN düzeylerinin Mannitol ya da vaptanlarla ilişkisine dair bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak bulgularımızda CON10 ve CON20 tedavi gruplarında progranulin düzeylerinde, MAN grubuna göre anlamlı bir artış ortaya çıktı ($p < 0,01$). PGRN'nin nöroprotektif etkisi ve MAN grubuna göre NSE düzeylerinde azalmaya neden olması, beyin frontal lob kesitlerinin histolojik bulgularıyla da paralel olarak, Conivaptan'ın KBB ve nöron hasarına karşı Mannitol'den daha etkili olabileceğini gösterdi.

5.8. Sitokin Düzeyleri (TNF- α , IL-15 ve IL-35)

Sitokinler protein ya da glikoprotein yapıda olup, homeostazı sağlamak üzere immun sistem, inflamasyon, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre ölümü, anjiyogenez ve onarım süreçleriyle ilişkili olan hücreler üzerinde düzenleyici etkiler gösteren reseptör aracılı sinyal mekanizmalarında rol oynamaktadır. Çeşitli hasar uyaranlarına yanıt olarak salınan sitokinler, vücutta çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir (Hallenbeck, 2002).

İskemik inmenin heterojen özelliği nedeniyle, altta yatan patofizyolojik süreçlere bağlı olarak, inflamatuvar yolakların farklı etkiler gösterebileceği belirtilmektedir. Beyindeki bu sitokinlerin birçoğunun işlevleri ve etkileri henüz açıklığa kavuşturulmamakla birlikte, hem yararlı hem de zararlı etkilere sahip olabilecekleri belirtilmektedir (Tuttolomondo, Di Raimondo, di Sciacca, Pinto & Licata, 2008).

TNF- α , inme sonrasında nörorejenerasyonu modüle edebilen, KBB'yi geçerek MSS'ye girebilen, yaygın olarak bulunan bir sitokindir (Pan vd., 2006; Pan vd., 2013) ve MSS'ye yönelik deneysel ve klinik travmalarda hızla tetiklendiği vurgulanmaktadır (Hallenbeck, 2002). İlk kez 1994 yılında, kalıcı MCAO yapılan sıçanlarda, iskemik kortekste TNF- α mRNA'sının indüksiyonun gerçekleştiği bildirilmiştir. İndüksiyonun iskemik kortekste MCAO'dan 1 saat sonra gerçekleştiği, 12 saatte pik yaptığı ve 3. saatten 5. güne kadar anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (Liu vd., 1994).

Serebrovasküler endotel üzerinde konumlanan astrositik uzantıların, KBB geçirgenliğini değiştiren; inflamasyonun çözünür ve hücrel medyatörlerinin MSS'ye infiltrasyonunu arttıran TNF ekresyonu yapabileceği belirtilmektedir. TNF, astrositlerde otokrin bir şekilde de işlev görerek kendi sekresyonu da artırabilmektedir. Ayrıca TNF'nin endotel üzerindeki pro-inflamatuvar ve pro-coagulan etkilerinin, beyin iskemisinde mikrosirkülasyon perfüzyonunu bozabileceği ileri sürülmüştür (Hallenbeck, 2002). Bununla ilişkili olarak, spontan hipertansif sıçanlarda, TNF- α aktivitesinin inhibisyonunun, fokal serebral iskemiye takiben iskemik hasarı azalttığı ve mikrovasküler perfüzyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (Dawson, Martin & Hallenbeck, 1996) ve bu sonuçların, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin inme patofizyolojisinde önemli olduğuna dair hipotezi desteklediği vurgulanmıştır.

Çalışmamızda İ/R grubunda TNF- α düzeylerinde, Kontrol grubuna göre anlamlı artış meydana geldiği görüldü ($p=0,001$). En yüksek TNF- α ortalaması bu gruba aitti. Bu bulgular, TNF- α 'nın pro-inflamatuvar etkisi düşünüldüğünde, iskemi-reperfüzyon sürecinde nöroinflamasyonun tetiklendiğini düşündürdü. CON10 ve CON20 tedavi gruplarında, İ/R grubuna

göre TNF- α düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0,001$). Mannitol'ün TNF- α düzeylerinde bir düşüşe yol açmaması, Conivaptan'ın inflamatuvar yanıtı, Mannitol'den daha etkili bir şekilde kontrol altına alabileceğini gösterdi, ancak bunu olasılıkla akuaretik etkisi doğrultusunda gerçekleştirdi.

TNF- α ile yapılan çalışmalarla IL-15'in KBB'deki önemli fonksiyonları belirlenmiştir (Pan vd., 2013). IL-15 anti-apoptotik ve nörotrofik özelliğe sahiptir (Budagian vd., 2006) ve IL15R α , IL2R β ve IL2R γ olarak adlandırılan trimerik bir reseptör kompleksi üzerinden etki göstermektedir (Pan vd., 2013). TNF- α 'in, IL15R α mRNA ve proteininin ekspresyonunu arttırdığı ve IL-15'ün post-translasyonel sürecini hızlandırdığı, IL-15 reseptörünün trimerik kompleksinin diğer bileşenleri olan IL2R β ve IL2R γ 'nın ekspresyonunu modüle ettiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda IL-15'in KBB düzeyinde TNF sinyalinin yeni bir mediatörü olduğunu ve TNF- α sinyalini amplifiye ve modüle etmek üzere görev yaptığını göstermektedir (Pan, Yu, Hsuchou, Khan & Kastin, 2009)

Yapılan bir çalışmada TNF ve IL-15 sistemi arasındaki etkileşimler, TNF knock-out farelerde, TNF R1 ve R2 çift reseptör knock-out farelerde ve wild-tip kontrollerde IL15 reseptör ekspresyonundaki değişiklikler ile açıklanmaya çalışılmıştır. IL15R α mRNA'sının, TNF knock-out farelerin hipokampus ve hipotalamusunda ve Reseptör knock-out farelerin ise striatumunda down-regüle olduğu tespit edilmiştir. IL2R β mRNA'sı, TNF knock-out farelerde her üç bölgede ve Reseptör knock-out farelerde ise hipokampusda azalmıştır, ancak Reseptör knock-out farelerin striatumunda artış göstermiştir. Buna karşılık, IL2R γ mRNA'sı hem TNF knock-out hem de Reseptör knock-out farelerin hipokampusunda azalma gösterirken, hipotalamusunda sadece TNF knock-out farelerde azalma göstermiştir. Bu sonuçların, TNF'nin yokluğunun, IL15R α 'nın ve onun hipokampus ve hipotalamustaki eş-reseptörlerinin down-regülasyonu yoluyla kompensatuar azalmaya yol açtığı ileri sürülmüştür (Pan vd., 2013).

Çalışmamızda IL-15 düzeyleri kontrol ile karşılaştırıldığında, İ/R ve Mannitol grubunda artış gösterirken, Conivaptan gruplarında azaldı. Bu değişiklikler Kontrol'e göre CON10 grubu ($p<0,001$); İ/R grubuna göre her iki Conivaptan tedavi grupları ($p<0,001$) ve Mannitol grubuna göre yine Conivaptan tedavi grupları arasında anlamlıydı ($p<0,001$).

Tüm gruplarda IL-15 ve TNF- α 'nın paralel artış/azalma gösterdikleri görüldü. Bu bulgu, IL-15'in TNF- α ile yakın ilişkili olduğu görüşünü destekledi. Bunun yanı sıra, gruplarda IL-15 ile NSE düzeylerinin aynı yönde (artış/azalma) hareket etmesi, IL-15'in KBB hasarı üzerinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürdü. Bunun için korelasyon çalışmaları ve immunohistokimyasal boyamaların yapılması faydalı olabilir.

Kontrol ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda IL-35 düzeylerinde artış olsa da, bu artış yalnızca Kontrol ile CON20 tedavi grubu arasında anlamlılık gösterdi ($p < 0,001$). Literatürde serebral iskemi-reperfüzyon modelinde IL-35 düzeylerinin incelendiği, Mannitol ya da vaptanlarla ilişkilendirildiği bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle, IL-15 ve IL-35'in MSS patolojileriyle ilişkili pro-inflamatuar, anti-inflamatuar ya da immunmodülasyon olası rolü ve yararlılığı hakkında, kapsamlı ve güvenilir çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.9. Miyeloperoksidaz Aktivitesi

Doku hasarına karşı inflammatuar yanıtta salgılanan önemli bir enzim olan MPO'nun, deneysel bir fare inme modelinde yapılan non-invazif Manyetik Rezonans Görüntüleme çalışmaları sonucunda, iskemik dokularda geniş çapta dağılım gösterdiği ve infarkt büyüklüğüyle pozitif yönde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Breckwoldt vd., 2008). Aynı çalışmada, MPO-duyarlı bir ajanın *in vivo* aktivasyonu, MPO aktivite testleri ve Real time-PCR analizleri yardımıyla, MPO aktivitesinin pik seviyesinin, iskemiden sonra 3. günde; MPO salgılayan nötrofillerin daha erken (1-3. günler), makrofaj/mikrogliaların ise daha sonra pik seviyesine ulaştığı gözlenmiştir (3-7. günler).

Fokal serebral iskemi-reperfüzyon fare modeli oluşturularak yapılan bir diğer çalışmada, MPO aktivitesinin nörogenез ve nörolojik sonlanım ile ters oranda ilişkili olduğu; inmede MPO inhibisyonu ya da eksikliğinin nörogenезi hücre proliferasyonu, farklılaşma ve migrasyonu da kapsayan pek çok yönden desteklemede, önemli endojen kaynakları stimüle eden bir ortam oluşturduğu ileri sürülmüştür (Kim vd., 2016).

Bu çalışmada, MPO aktivitesinin yalnızca İ/R grubunda arttığı, diğer tüm gruplarda azaldığı gözlemlendi. Ancak gruplar arası MPO aktivitelerinde anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). Beyin dokusu kesitleri incelendiğinde, dokuya immun sistem hücrelerinin infiltrasyonunun gerçekleştiğini kanıtlayan histolojik bir bulguya rastlanmadı. Bunun nedeni, çalışmada belirlenen sürede MPO sekresyonu yapan inflammatuar hücre göçünün muhtemel olarak henüz gerçekleşmemiş olması olabilir.

5.10. Beyin Ödeminin Tespiti

İskemik beyin ödem, serebral hasarın en önemli komplikasyonlarından biridir ve klinikte inmenin yönetiminde büyük öneme sahiptir. Hastalarda ödeme eşlik eden elektrolit homeostazının bozulması, nörolojik disfonksiyon, hemorajik transformasyon ve serebral herniasyonlar kötü sonlanıma neden olabilmektedir.

Erken dönem sitotoksik ödemde suyun içeri yönde alımı, Straling prensibine göre ozmotik aktivite ve hidrostatik basınç gradiyentlerindeki artışa dayanılarak açıklanmaktadır. MCA oklüzyonu yapılarak beyin ödeminin incelendiği bir çalışmada, oklüzyondan üç saat sonra ödemin gelişmeye başladığı; artışın ikinci ve üçüncü günlerde hızla maksimuma çıktığı ve daha sonra yavaş yavaş gerilemeye başladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada beyin su içeriği ve sodyum ilişkisinin incelendiğinde, oklüzyonu takiben ilk altı saat içinde anlamlı bir farklılık oluşmadığı, ancak ilişkinin bu süreden sonra giderek arttığı bildirilmiştir (Gotoh, Asano, Koide & Takakura, 1985).

Çalışmamızda Kontrol grubuna göre, tüm gruplarda beyin su içeriği yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0,01$). Bunun dışında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). İ/R grubunda beyin su içeriği düşüşü dikkat çekicidir. Ancak, İ/R grubuna diğer gruplardakine eşdeğer hacimde serum fizyolojik infüzyonu yapıldığı için, serum fizyolojinin az da olsa diürez etkisi nedeniyle, beklenen bir durumdu. Ayrıca su içeriklerinin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemesi, çalışmamızda belirlenen deney sonlandırma süresinin nispeten kısa olması nedeniyle olabilir. Bu süre zarfında muhtemel olarak hücrelerde sitotoksik ödem söz konusuydu ve vazojenik ödem için, literatürle de uyumlu olarak (Gotoh vd., 1985), daha uzun süre gerekmekteydi. Ancak oluşturduğumuz bu modelde belirlediğimiz iskemi süresi, beyin ödemi takibi için hayvanların daha uzun süre hayatta kalmalarını sağlamada uygun değildi. İskemi süresinin kısaltılmasının, bu modelde ödem sürecini uzun bir aralıkta değerlendirmek için daha uygun olabilir.

Yapılan histolojik incelemelerde, İ/R grubunda özellikle frontal korteks bölgesinde ödematöz oluşumlara, apoptotik nöronlara ve nöron dejenerasyonlarına rastlandı. İ/R grubuna ait beyin frontal lob kesitlerinin incelenmesinde, apoptoza uğrayan çok sayıda nöron varlığı gözlemlendi. CON10 grubuna ait beyin frontal korteksi kesitlerinde, ödemin diğer gruplara göre çok daha az ve beyin histolojisinin genel olarak kontrole yakın olduğu tespit edildi. Bu durum, özellikle Conivaptan 10 mg/mL doz uygulamasının, doku hasarının önlenmesinde olası olarak daha etkili olabileceğini gösterdi.

Deney gruplarına ait beyin hipokampus kesitlerinin Hematoksilen-Eosin incelemelerinde, histolojik yapının normal olduğu gözlemlendi ve ödem, inflamasyon veya nöron hasarına rastlanmadı. Hipokampus kesitlerinin TUNEL incelemelerinde de, nöron hasarı ve apoptoz açısından gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi. Bu durum, oluşturulan bu modelde, olası hipokampus hasarının akut dönemde değerlendirilemeyeceğini, bunun yerine geç dönemde incelenmesinin daha uygun olabileceğini düşündürdü.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, beyin ödemi için serebral İ/R oluşturulan sıçanlara ait serum ve beyin dokusu örneklerinin, biyokimyasal ve histolojik bulguları doğrultusunda, post-iskemik serebral hasar, inflamasyon ve ödem meydana geldiği tespit edildi. Çalışma, akut dönem tedavi etkinliğini incelemek amacıyla, kısa sürede sonlandırılrsa da, yapılan analizler, doza bağlı olarak akuaretik Conivaptan'ın, klinik yararlılığı tartışmalı olan diüretik Mannitol'e göre, doku hasarının önlenmeside, inflamasyonun kontrollü sürdürülmesi ve renal su atılımı ile beyin hidromineral dengesinin sağlanmasında, olası olarak daha etkili olabileceğini gösterdi.

Serebral İ/R hayvan modellerinin bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan biri hayvanlar arası kollateral dolaşımdaki varyasyonlar nedeniyle, infarktüs büyüklüğü ve dağılımları bakımından farklılıklar görülmesidir. Ayrıca iskemi modellerinde uygulanan cerrahi işlemlerin geri-dönüşümlü olması, her ilaç tedavilerinin değerlendirilebilmesinde bir gereklilik olsa da, gruplar arasında farklılıklarının tespit edilebilmesine bir sınırlama getiriyor olabilir. Bu açıdan, *in vitro* çalışmalar, özellikle KBB'de yer alan ve beyin hidromineral homeostazında rol oynayan hücrelerin ko-kültüre edilerek tedavi planlaması yapılması önerilebilir.

Beyin ödeminde, erken dönem tedavi etkinliğinin klinikte hayati öneme sahip olması nedeniyle çalışma süresi kısa tutuldu. İlaç tedavilerinin sonlanım üzerine etkisi büyük öneme sahiptir. Bu nedenle uzun süreli bir planlanma ve tedavinin takibi, prognoz ve sonlanım hakkında değerli veriler sağlayabilir.

Deneyisel kombine ilaç tedavileri, son yıllarda literatürde ön plana çıkmaktadır. Beyin ödeminde özellikle infüzyon yoluyla uygulanabilen ilaç kombinasyonlarının denenmesi faydalı bilgiler sağlayabilir.

Deneyisel çalışmalarda, tedavi sürecinde ödem sıvısının ya da belirlenen bir molekülün vasküler sistemde yer değiştirme hareketinin, çeşitli izleyici maddeler kullanılarak takip edilebilmesini mümkün kılması nedeniyle, görüntüleme tekniklerinin kullanılması önerilebilir.

Beyinde ödem mekanizması henüz açığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenle spesifik bir biyobelirtece/yolak üzerine yoğunlaşılması ve incelenen değişkenlere yönelik korelasyon çalışmalarının yapılması, önemli detaylar sağlayabilmesi açısından önerilebilir.

Bulgularımızın güvenilir ve kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi, tedavinin kliniğe uyarlanabilmesinde yararlı bilgiler sağlayabilmesi açısından önemli bir ihtiyaçtır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*, 200(6), 629-638.
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1), 13-25.
- Acosta, S. A., Tajiri, N., Hoover, J., Kaneko, Y., Borlongan, C. V. (2015). Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke. *Stroke*, 46: 2616-27.
- Aditya, S., Rattan, A. (2012). Vaptans: A new option in the management of hyponatremia. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2(2): 77-83.
- Aktümsek, A. (2015). *Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi*. (9.Basım). Ankara: Nobel.
- Alavi, F.K.(2004). *Pharmacology/Toxicology Review And Evaluation*. Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Erişim:http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021697s000_VaprisolTOC.cfm
- Ali, F., Raufi, M. A., Washington, B., Ghali, J. K. (2007). Conivaptan : A Dual Receptor Vasopressin V1a/V2 Antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews*, 25, 261-79.
- Amantea, D., Tassorelli, C., Petrelli, F., Certo, M., Bezzi, P., Micieli, G., Corasaniti, M.G., Bagetta, G. (2014). Understanding the multifaceted role of inflammatory mediators in ischemic stroke. *Curr Med Chem*, 21(18), 2098-2117.
- Ameli, P. A., Ameli, N. J., Gubernick, D. M., Ansari, S., Mohan, S., Satriotomo, I., Buckley, A. K., Maxwell Jr., C. W., Nayak, V. H. & Hedna, V. S. (2014). Role of vasopressin and its antagonism in stroke related edema. *J Neurosci Res*, 92(9), 1091-1099.
- Arifoğlu, Y. (2017). Her Yönüyle Anatomi. (1. Baskı). Çapa: İstanbul Tıp Kitabevleri.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bacigaluppi, M., Comi, G., Hermann, D. M. (2010). Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. *The Open Neurology Journal*, 4, 34-8.
- Banchereau, J., Pascual, V., O'Garra, A. (2012). From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 13(10), 925-31.
- Banks, W. A., & Erickson, M. A. (2010). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis*, 37(1), 26-32.
- Barone, F. C., Clark, R. K., Price, W. J., White, R. F., Feuerstein, G. Z., Storer, B. L., & Ohlstein, E. H. (1993). Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res*, 623(1), 77-82.
- Bateman, A., & Bennett, H. P. J. (1998). Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *Journal of Endocrinology*, 158, 145-51.
- Belayev, L., Liu, Y., Zhao, W., Busto, R., & Ginsberg, M. D. (2001). Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke*, 32(2), 553-560.
- Bentsen, G., Breivik, H., Lundar, T., Stubhaug, A. (2006). Hypertonic saline (7.2%) in 6% hydroxyethyl starch reduces intracranial pressure and improves hemodynamics in a placebo-controlled study involving stable patients with subarachnoid hemorrhage. *Critical Care Medicine*, 34(12), 2912-7.
- Berl, T. (2015). Vasopressin Antagonists. *New England Journal of Medicine*, 372(23), 2207-2216.
- Berne, R. M., Levy, M. N., Koeppen, B. M., Staton, A. B. (2008). *Fizyoloji* (5. Baskı Çeviri). Güneş Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Betz, A. L., Keep, R. F., Beer, M. E., & Ren, X. D. (1994). Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(1), 29-37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bhalla, A., Sankaralingam, S., Dundas, R., Swaminathan, R., Wolfe, C. D. A., & Rudd, A. G. (2000). Influence of Raised Plasma Osmolality on Clinical Outcome After Acute Stroke. *Stroke*, 31(9), 2043-2048.
- Bhardwaj, A. (2007). Osmotherapy in Neurocritical Care, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7, 513-21.
- Bouchard, B. A., Shatos, M. A., & Tracy, P. B. (1997). Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(1), 1-9.
- Breckwoldt, M. O., Chen, J. W., Stangenberg, L., Aikawa, E., Rodriguez, E., Qiu, S., Moskowitz, M. A., Weissleder, R. (2008). Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(47), 18584-18589.
- Brocker, C., Thompson, D. C., & Vasiliou, V. (2012). The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts*, 3(4), 345-364.
- Brunton, L. L. (2011). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS* (12.Basım). New York: McGraw-Hill.
- Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R., & Bulfone-Paus, S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(4), 259-280.
- Cai, D. (2013). Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(1), 40-7.
- Castillo, L. B., Bugedo, G. A., Paranhos, J. L. (2009). Mannitol or hypertonic saline for intracranial hypertension? A point of view. *Critical Care and Resuscitation*, 11(2), 151-4.
- Chang, Y., Chen, T. Y., Chen, C. H., Crain, B. J., Toung, T. J., & Bhardwaj, A. (2006). Plasma arginine-vasopressin following experimental stroke: effect of osmotherapy. *J Appl Physiol* (1985), 100(5), 1445-1451.
- Cheng, F., Yuan, Q., Yang, J., Wang, W., & Liu, H. (2014). The prognostic value of serum neuron-specific enolase in traumatic brain injury: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(9), e106680.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Costello-Boerrigter, L. C., Boerrigter, G., Jr, J. C. B. (2009). Pharmacology of vasopressin antagonists. *Heart Failure Reviews*, 14, 75-82.
- Cserr, H. F. (1988). Role of secretion and bulk flow of brain interstitial fluid in brain volume regulation. *Ann N Y Acad Sci*, 529, 9-20.
- Cunningham, R. T., Watt, M., Winder, J., McKinstry, S., Lawson, J. T., Johnston, C. F., Hawkins, S. A., Buchanan, K. D. (1996). Serum neurone-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur J Clin Invest*, 26(4), 298-303.
- Daniel, R., He, Z., Carmichael, K. P., Halper, J., Bateman, A. (2000). Cellular Localization of Gene Expression for Progranulin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48, 999-1009.
- Davalos, A., Ricart, W., Gonzalez-Huix, F., Soler, S., Marrugat, J., Molins, A., Soler, S., Genis, D. (1996). Effect of malnutrition after acute stroke on clinical outcome. *Stroke*, 27(6), 1028-1032.
- Dawson, D. A., Martin, D., & Hallenbeck, J. M. (1996). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett*, 218(1), 41-44.
- Decaux, G., Soupart, A., Vassart, G. 2008. "Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans", *Lancet*, 371, 1624-32.
- Dembic, Z. (2015). Common Features About Cytokines. The Cytokines of the Immune System. The role of cytokines in disease related to immune response. Elsevier.
- Dhar, R. & Murphy-Human, T. (2011). A bolus of conivaptan lowers intracranial pressure in a patient with hyponatremia after traumatic brain injury. *Neurocrit Care*, 14(1), 97-102.
- Doczi, T., Laszlo, F. A., Szerdahelyi, P., & Joo, F. (1984). Involvement of vasopressin in brain edema formation: further evidence obtained from the Brattleboro diabetes insipidus rat with experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, 14(4), 436-441.
- Dökmeci, İ., Dökmeci, H. (2007). *Türkiye İlaç Rehberi*. (6. Baskı). İstanbul Medikal Yayıncılık.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Durukan, A., Tatlisumak, T.(2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 87, 179-197.
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest*, 52(12), 3212-3219.
- Dziedzic, T., Slowik, A., & Szczudlik, A. (2004). Serum Albumin Level as a Predictor of Ischemic Stroke Outcome. *Stroke*, 35(6), e156-e158.
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497-511.
- Farbyszewski, R., Bielawski, K., Bielawska, A., & Sobaniec, W. (1995). Spermine protects in vivo the antioxidant enzymes in transiently hypoperfused rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 55(4), 253-258.
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317-1327.
- Ferris, C. F., Lu, S. F., Messenger, T., Guillon, C. D., Heindel, N., Miller, M., Koppel, G., Robert, B. F, Simon, N. G. (2006). Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 83(2), 169-174.
- Fofi, L., Dall'Armi, V., Durastanti, L., Valenza, A., Lorenzano, S., Prencipe, M., & Toni, D. (2012). An observational study on electrolyte disorders in the acute phase of ischemic stroke and their prognostic value. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(4), 513-516.
- Forsyth, L. L., Liu-DeRyke, X., Jr, D. P., Rhoney, D. H. (2008). Role of Hypertonic Saline for the Management of Intracranial Hypertension After Stroke and Traumatic Brain Injury. *Pharmacotherapy*, 28(4), 469-84.
- Gass, J., Lee, W. C., Cook, C., Finch, N., Stetler, C., Jansen-West, K., Lewis, J., Link, C. D., Rademakers, R., Nykjaer, A., Petrucelli, L. (2012). Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of Sortilin. *Molecular Neurodegeneration*, 7(33), 1-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe?. *Journal of NeuroVirology*, 8, 474-9.
- Ghidoni, R., Paterlini, A., & Benussi, L. (2012). Circulating progranulin as a biomarker for neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 1(2), 180-90.
- Giknis, M. L. A. & Clifford, C. B. (2006). Clinical Laboratory Parameters for Crl:CD(SD) Rats. Charles River Laboratories.
Erişim: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-igs-rat?loc=TR>
- Gido, G., Kristian, T., & Siesjo, B. K. (1997). Extracellular Potassium in a Neocortical Core Area After Transient Focal Ischemia. *Stroke*, 28(1), 206-210.
- Ginsberg, M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55(3), 363-389.
- Glushakova, O., Glushakov, A., Miller, E., Valadka, A., & Hayes, R. (2016). Biomarkers for acute diagnosis and management of stroke in neurointensive care units. *Brain Circulation*, 2(1), 28-47.
- Gomez-Nicola, D., Valle-Argos, B., Pita-Thomas, D. W., Nieto-Sampedro, M. (2008). Interleukin 15 Expression in the CNS: Blockade of Its Activity Prevents Glial Activation After an Inflammatory Injury. *Glia*, 56, 494-505.
- Gotoh, O., Asano, T., Koide, T., & Takakura, K. (1985). Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. *Stroke*, 16(1), 101-109.
- Göbel, M., Eisele, L., Möllmann, M., Hüttmann, A., Johansson, P., Scholtysik, R., Bergmann, M., Busch, R., Döhner, H., Hallek, M., Seiler, T., Stilgenbauer, S., Klein-Hitpass, L., Dührsen, U., Dürig, J. (2013). Progranulin Is a Novel Independent Predictor of Disease Progression and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, 8(8), 1-9.
- Grande, P. O., & Romner, B. (2012). Osmotherapy in brain edema: a questionable therapy. *J Neurosurg Anesthesiol*, 24(4), 407-412.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Greenberg, A., Verbalis, J. (2006). Vasopressin receptor antagonists. *Kidney International*, 69(12), 2124-30.
- Güler, A., Çiftçi, Ş., & Şirin, H. (2016). Serebral Kan Dolaşımı, İskemi Fizyopatolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiovascular Surgery Special Topics*, 8(1), 1-7.
- Gültürk, S., İmir, G., & Tuncer, E. (2007). Kanbeyin bariyeri. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 29(2), 147-154.
- Hallenbeck, J. M. (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med*, 8(12), 1363-1368.
- Halliwell, B. (1988). Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*, 37(4), 569-571.
- Hanoune J. (2010). Pharmacology of the vasopressin receptors. In Laycock J.F. (Ed.), *Perspectives on vasopressin (pp.120-127)*. London: Imperial College Press
- Harukuni, I., Bhardwaj, A. (2006). Mechanisms of Brain Injury after Global Cerebral Ischemia. *Neurologic Clinics*, 24(1), 1-21.
- HE, Z., ONG, C. H. P., HALPER, J., BATEMAN, A. (2003). Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature Medicine*, 9(2), 225-9.
- Human, T., Onuoha, A., Diringer, M., & Dhar, R. (2012). Response to a bolus of conivaptan in patients with acute hyponatremia after brain injury. *J Crit Care*, 27(6), 745.e741-745.
- Ikeda, Y., Toda, S., Kawamoto, T., & Teramoto, A. (1997). Arginine vasopressin release inhibitor RU51599 attenuates brain oedema following transient forebrain ischaemia in rats. *Acta Neurochir (Wien)*, 139(12), 1166-1171; discussion 1171-1162.
- Iloff, J. J., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2015). Implications of the discovery of brain lymphatic pathways. *Lancet Neurol*, 14(10), 977-979.
- Isgro, M. A., Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*, 867, 125-143.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Jackman, K., Kahles, T., Lane, D., Garcia-Bonilla, L., Abe, T., Capone, C., Hochrainer K., Voss, H., Zhou, P., Ding, A., Anrather, J., Iadecola, C. (2013). Progranulin Deficiency Promotes Post-Ischemic Blood-Brain Barrier Disruption. *The Journal of Neuroscience*, 33(50), 19579-589.
- Jagadeesh, J. S., Muthiah, N. S., Muniappan, M. (2014). Vasopressin Receptors and Drugs:A Brief Perspective. *Global Journal of Pharmacology*, 8(1), 80-3.
- Jessen, N. A., Munk, A. S., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*, 40(12), 2583-2599.
- Jia, S. W., Liu, X. Y., Wang, S. C., & Wang, Y. F. (2016). Vasopressin Hypersecretion-Associated Brain Edema Formation in Ischemic Stroke: Underlying Mechanisms. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 25(6), 1289-1300.
- Jian, J., Konopka, J., Liu, C. (2013). Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 93, 199-208.
- Joynt, R. J., Feibel, J. H., & Sladek, C. M. (1981). Antidiuretic hormone levels in stroke patients. *Ann Neurol*, 9(2), 182-184.
- Kantarıcı, G., Demiran, G. (2011). Eski Hastalıklar İçin Yeni Fırsatlar: Akuaretikler (Vazopresin Reseptör Antagonistleri). *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 20(1), 14-8.
- Kamel, H., Navi, B. B., Nakagawa, K., Hemphill, J. C., Ko, N. U. (2011). Hypertonic saline versus mannitol for the treatment of elevated intracranial pressure: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical Care Medicine*, 39(3), 554-9.
- Kanazawa, M., Kawamura, K., Takahashi, T., Miura, M., Tanaka, Y., Koyama, M., Toriyabe, M., Igarashi, H., Nakada, T., Nishihara, M., Nishizawa, M., Shimohata, T. (2015). Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain*, 138(Pt 7), 1932-1948.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kapural, M., Krizanac-Bengez, L., Barnett, G., Perl, J., Masaryk, T., Apollo, D., Rasmussen, P., Mayberg, M. R., Janigro, D. (2002). Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res*, 940(1-2), 102-104.
- Kebir, D., & Filep, J. G. (2013). Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins. *Front Immunol*, 4, 60.
- Keep, R. F., Hua, Y., & Xi, G. (2012). Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol*, 11(8), 720-731.
- Kempinski, O. S., Volk, C. (1994). Neuron-Glial Interaction During Injury and Edema of the CNS. *Acta neurochirurgica*, Supplement, 60, 7-11.
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, 81(3), 302-313.
- Kim, J. A., Tran, N. D., Li, Z., Yang, F., Zhou, W., & Fisher, M. J. (2006). Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(2), 209-217.
- Kim, H., Wei, Y., Lee, J. Y., Wu, Y., Zheng, Y., Moskowitz, M. A., & Chen, J. W. (2016). Myeloperoxidase Inhibition Increases Neurogenesis after Ischemic Stroke. *J Pharmacol Exp Ther*, 359(2), 262-272.
- Klatzo, I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathologica*, 72, 236-9.
- Klatzo, I. (1994). Evolution of Brain Edema Concepts. *Acta Neurochirurgica*, 60, 3-6.
- Koehler, R. C., Roman, R. J., & Harder, D. R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*, 32(3), 160-169.
- Kozler, P., Sobek, O., & Pokorny, J. (2015). Signs of myelin impairment in cerebrospinal fluid after osmotic opening of the blood-brain barrier in rats. *Physiol Res*, 64 Suppl 5, S603-608.
- Köksel, T., Güteryüz, A. (2001). BEYİN ÖDEMİ. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(1), 83-93.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Krishnankutty, S. V., Rajan, S. (2016). The effect of intravenous conivaptan on intraocular pressure. *Journal of ophthalmic & vision research*, 11(1), 126-7.
- Kumar, V., Abbas, K. A., Aster, J. (2014). *ROBBINS Temel Patoloji*. Sayfa 29-73. Tuzlalı, S., Güllüoğlu, M., Çevikbaş, U. (Ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Kumral, E. (2001). *Akut İskemik İnme*. İstanbul: Akal Ofset.
- Kurusu, K., Abumiya, T., Nakamura, H., Shimbo, D., Shichinohe, H., Nakayama, N., Kazumata, K., Shimizu, H., Houkin, K. (2016). Transarterial Regional Brain Hypothermia Inhibits Acute Aquaporin-4 Surge and Sequential Microvascular Events in Ischemia/Reperfusion Injury. *Neurosurgery*, 79(1), 125-134.
- Kurt C. B. K. & Tuncer A. K. (2015). İmmunolojik Bakış Açısı ile Kan-Beyin Bariyeri. *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, 8(4), 1-7.
- Kutluk, K. (2004). *İskemik İnme*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7(97).
- Laszlo, F. A., Varga, C., & Nakamura, S. (1999). Vasopressin receptor antagonist OPC-31260 prevents cerebral oedema after subarachnoid haemorrhage. *Eur J Pharmacol*, 364(2-3), 115-122.
- Lau, D., & Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*, 111(1), 16-26.
- Li, J., Han, B., Ma, X., & Qi, S. (2010). The effects of propofol on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following forebrain ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res*, 1356, 11-23.
- Lin, S. Y., Tang, S. C., Tsai, L. K., Yeh, S. J., Shen, L. J., Wu, F. L. L., Jeng, J. S. (2015). Incidence and Risk Factors for Acute Kidney Injury Following Mannitol Infusion in Patients With Acute Stroke. *Medicine*, 94(47), 1-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79(4), 1431-1568.
- Liu, X., Jin, Y., Zheng, H., Chen, G., Tan, B., & Wu, B. (2000). Arginine vasopressin gene expression in supraoptic nucleus and paraventricular nucleus of hypothalamus following cerebral ischemia and reperfusion. *Chin Med Sci J*, 15(3), 157-161.
- Liu, X., Nakayama, S., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., & Bhardwaj, A. (2010). Arginine-vasopressin V1 but not V2 receptor antagonism modulates infarct volume, brain water content, and aquaporin-4 expression following experimental stroke. *Neurocrit Care*, 12(1), 124-131.
- Lo, E. H., Wang, X., & Cuzner, M. L. (2002). Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res*, 69(1), 1-9.
- Male, S., Nickele, C. & Eljovich, L. (2016). Critical Care of Brain Reperfusion. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 16(3), 23.
- Manaenko, A., Fathali, N., Khatibi, N. H., Lekic, T., Hasegawa, Y., Martin, R., Tang J., Zhang, J. H. (2011). Arginine-vasopressin V1a receptor inhibition improves neurologic outcomes following an intracerebral hemorrhagic brain injury. *Neurochem Int*, 58(4), 542-548.
- Marangos, P. J., Zis, A. P., Clark, R. L., & Goodwin, F. K. (1978). Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res*, 150(1), 117-133.
- Marko, N. F. (2012). Hypertonic saline, not mannitol, should be considered gold-standard medical therapy for intracranial hypertension. *Marko Critical Care*, 16, 113.
- McBean, D. E., & Kelly, P. A. (1998). Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol*, 30(4), 431-434.
- McManus, M. L., & Soriano, S. G. (1998). Rebound swelling of astroglial cells exposed to hypertonic mannitol. *Anesthesiology*, 88(6), 1586-1591.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Menzies, S. A., Betz, A. L., & Hoff, J. T. (1993). Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema. *J Neurosurg*, 78(2), 257-266.
- Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., & Kaps, M. (1997). S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*, 28(10), 1956-1960.
- Molnar, A. H., Varga, C., Berko, A., Rojik, I., Parducz, A., Laszlo, F., & Laszlo, F. A. (2008). Inhibitory effect of vasopressin receptor antagonist OPC-31260 on experimental brain oedema induced by global cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien)*, 150(3), 265-271.
- Murphy, S. J., McCullough, L. D., & Smith, J. M. (2004). Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. *Ilar j*, 45(2), 147-159.
- Nag, S. (2011). Morphology and properties of brain endothelial cells. *Methods Mol Biol*, 686, 3-47.
- Narayan, G., Mandal, S. N. (2012). Vasopressin receptor antagonists and their role in clinical medicine. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(2), 183-91.
- Neuwelt, E. A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Iadecola, C., Janigro, D., Leybaert, L., Molnár, O'Donnell M. E., Z., J. T., Saunders, N. R., Sharp, F., Stanimirovic, D., Watts, R. J & Drewes, L. R. (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*, 12(3), 169-182.
- Nishioku, T., Matsumoto, J., Dohgu, S., Sumi, N., Miyao, K., Takata, F., Shuto, H., Yamauchi, A. & Kataoka, Y. (2010). Tumor necrosis factor- α mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci*, 112(2), 251-254.
- Ock, S., Jo, S., Lee, J. B., Jin, Y., Jeong, T., Yoon, J., & Park, B. (2016). Comprehensive interpretation of hyperglycemia and hyperosmolality on the clinical outcomes among ischemic stroke patients. *Am J Emerg Med*, 34(12), 2343-2350.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Oh, S. H., Lee, J. G., Na, S. J., Park, J. H., Choi, Y. C., & Kim, W. J. (2003). Prediction of early clinical severity and extent of neuronal damage in anterior-circulation infarction using the initial serum neuron-specific enolase level. *Arch Neurol*, 60(1), 37-41.
- Okura, H., Yamashita, S., Ohama, T., Saga, A., Yamamoto-Kakuta, A., Hamada, Y., Sougawa, N., Ohyama, R., Sawa, Y., Matsuyama, A. (2010). HDL/Apolipoprotein A-I Binds to Macrophage-Derived Progranulin and Suppresses its Conversion into Proinflammatory Granulins. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17, 568-77.
- Ong, C. H. P., Bateman, A. (2003). "Progranulin (Granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, Acrogranin) in proliferation and tumorigenesis", *Histology and Histopathology*, 18, 1275-88.
- OpenStax College. (2013). *Anatomy & Physiology*. Texas: OpenStax College.
- Ökten, A.İ., Güzel A. (2012). Beynin Arteriyel Anatomisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 22(3): 171-188.
- Palmer, B.F. (2015). Vasopressin Receptor Antagonists. *Current Hypertension Reports*, 17(1).
- Palmer, B. F., Rock, A. D., Woodward, E. J. (2016). Dose comparison of conivaptan (Vaprisol®) in patients with euvolemic or hypervolemic hyponatremia—efficacy, safety, and pharmacokinetics. *Drug Design Development and Therapy*, 10, 339-51.
- Pan, W., Ding, Y., Yu, Y., Ohtaki, H., Nakamachi, T., & Kastin, A. J. (2006). Stroke upregulates TNF α transport across the blood-brain barrier. *Exp Neurol*, 198(1), 222-233.
- Pan, W., Wu, X., He, Y., Hsueh, H., Huang, E. Y.K., Mishra, P. K., Kastin, A. J. (2013). "Brain interleukin-15 in neuroinflammation and behavior", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(2), 184–92.
- Pan, W., Yu, C., Hsueh, H., Khan, R. S., Kastin, A. J. (2009). Cerebral microvascular IL15 is a novel mediator of TNF action. *Journal of Neurochemistry*, 111(3), 819–27.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Patankar, T. F., Mitra, D., Varma, A., Snowden, J., Neary, D., & Jackson, A. (2005). Dilatation of the Virchow-Robin space is a sensitive indicator of cerebral microvascular disease: study in elderly patients with dementia. *AJNR Am J Neuroradiol*, 26(6), 1512-1520.
- Patidar, M., Yadav, N., Dalai, S. K. (2016). Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 31, 49-59.
- Peri, A. (2013). The Use of Vaptans in Clinical Endocrinology. The *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98, 1321-32.
- Potts, M. B., DeGiacomo, A. F., Deragopian, L., & Blevins, L. S., Jr. (2011). Use of intravenous conivaptan in neurosurgical patients with hyponatremia from syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Neurosurgery*, 69(2), 268-273.
- Priyanka, N., Kumari, M., Kalra, N., Arjun, P., Naik, S. B., Pradeep, A. R. (2013). Crevicular Fluid and Serum Concentrations of Progranulin and High Sensitivity CRP in Chronic Periodontitis and Type 2 Diabetes. *Disease Markers*, 35(5), 389-94.
- Pulsinelli, W. A., & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3), 267-272.
- Pulsinelli, W. A., & Buchan, A. M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 19(7), 913-914.
- Rabinstein, A. A. (2006). Treatment of cerebral edema. *Neurologist*, 12(2), 59-73.
- Ramesh, G., MacLean, A. G., Philipp, M. T. (2013). Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration and Neuropathic Pain, Mediators of Inflammation, 20.
- Ransohoff, R. M., Benveniste E. N. (2006). *CYTOKINES and the CNS* (2.Basım). Boca Raton: CRC Press.
- Ray, R. S., & Katyal, A. (2016). Myeloperoxidase: Bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 611-620.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rondon-Berrios, H., Berl, T. (2016). Vasopressin receptor antagonists: Characteristics and clinical role, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30, 289-303.
- Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., McDermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'Donnell, C. J., Roger, V., Rumsfeld, J., Sorlie, P., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Hong, Y. (2007). Heart Disease and Stroke Statistics—2007 Update. *Circulation*, 115(5), 69-171.
- Rosenberg, G. A., Scremin, O., Estrada, E., & Kyner, W. T. (1992). Arginine vasopressin V1-antagonist and atrial natriuretic peptide reduce hemorrhagic brain edema in rats. *Stroke*, 23(12), 1767-1773; discussion 1773-1764.
- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., Vinters, H. V. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44(7), 2064-2089.
- Sahu, S., Nag, D. S., Swain, A., & Samaddar, D. P. (2017). Biochemical changes in the injured brain. *World J Biol Chem*, 8(1), 21-31.
- Salameh, T. S., & Banks, W. A. (2014). Chapter Nine-Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins to the CNS. In P. D. Thomas (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. Volume 71, pp. 277-299): Academic Press.
- Sa-Pereira, I., Brites, D., & Brito, M. A. (2012). Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol*, 45(2), 327-347.
- Salmina, A. B. (2009). Neuron-glia interactions as therapeutic targets in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 16(3), 485-502.
- Sandoval, K. E., & Witt, K. A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 32(2), 200-219.
- Saunders, N. R., Ek, C. J., Habgood, M. D., & Dziegielewska, K. M. (2008). Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci*, 31(6), 279-286.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Saunders, N. R., Habgood, M. D., Mollgard, K., & Dziegielewska, K. M. (2016). The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Res*, 5.
- Schraufstatter, I. U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., Quehenberger, O., & Cochrane, C. G. (1990). Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest*, 85(2), 554-562.
- Shuaib, A., Xu Wang, C., Yang, T., & Noor, R. (2002). Effects of nonpeptide V(1) vasopressin receptor antagonist SR-49059 on infarction volume and recovery of function in a focal embolic stroke model. *Stroke*, 33(12), 3033-3037.
- Silverman, I. E., Rymer, M. M., Caplan, L. R., Schmidt, R. E., & Spiegel, G. R. (2009). *Ischemic Stroke: An Atlas of Investigation and Treatment*: Clinical Publishing.
- Simard, J. M., Kent, T. A., Chen, M., Tarasov, K. V., & Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 6(3), 258-268.
- Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T., & Siesjo, B. K. (1984). Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand*, 69(6), 385-401.
- Stevens, S. L., Shaw, T. E., Dykhuizen, E., Lessov, N. S., Hill, J. K., Wurst, W., & Stenzel-Poore, M. P. (2003). Reduced Cerebral Injury in CRH-R1 Deficient Mice after Focal Ischemia: A Potential Link to Microglia and Astrocytes that Express CRH-R1. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(10), 1151-1159.
- Stokum, J. A., Kurland, D. B., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2015). Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema. *Neurochem Res*, 40(2), 317-328.
- Stokum, J. A., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2016). Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(3), 513-538.
- Suhail, M. (2010). Na(+), K(+)-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *Journal of Clinical Medicine Research*, 2(1), 1-17.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J., Egwuagu, C. E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, 75(2), 249-55.
- Sutherland, B. A., Minnerup, J., Balami, J. S., Arba, F., Buchan, A. M., & Kleinschnitz, C. (2012). Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke*, 7(5), 407-418.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, 132, 345-52.
- Szmydynger-Chodobska, J., Chung, I., Kozniowska, E., Tran, B., Harrington, F. J., Duncan, J. A., & Chodobski, A. (2004). Increased expression of vasopressin v1a receptors after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 21(8), 1090-1102.
- Şahan, M., Satar, S., Koç, A. F., Sebe, A. (2010). Acute Phase Reactants and Ischemic Stroke. *Archives Medical Review Journal*, 19(2), 85-140.
- Şener, G. & Yeğen, B. Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22(3), 5-13.
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., ... de Leon, M. J. (2015). Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*, 11(8), 457-470.
- Taya, K., Gulsen, S., Okuno, K., Prieto, R., Marmarou, C. R., & Marmarou, A. (2008). Modulation of AQP4 expression by the selective V1a receptor antagonist, SR49059, decreases trauma-induced brain edema. *Acta Neurochir Suppl*, 102, 425-429.
- Tao, J., Ji, F., Wang, F., Liu, B., & Zhu, Y. (2012). Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. *Brain Res*, 1436, 130-136.
- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., Shoham, M. (2001). The Basic And Clinical Pharmacology of Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(175-202).
- Thrane, A. S., Thrane, V. R., Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2015). Filtering the muddied waters of brain edema. *Trends Neurosci*, 38(6), 333-335.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tiainen, M., Roine, R. O., Pettila, V., & Takkunen, O. (2003). Serum neuron-specific enolase and S-100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia. *Stroke*, 34(12), 2881-2886.
- Toung, T. J. K., Chen, C.-H., Lin, C., Bhardwaj, A. (2007). Osmotherapy with hypertonic saline attenuates water content in brain and extracerebral organs. *Critical Care Medicine*, 35(2), 526-31.
- Trabold, R., Krieg, S., Scholler, K., & Plesnila, N. (2008). Role of vasopressin V(1a) and V2 receptors for the development of secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma*, 25(12), 1459-1465.
- Traystman, R. J. (2003). Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal*, 44(2), 85-95.
- Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., di Sciacca, R., Pinto, A., & Licata, G. (2008). Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des*, 14(33), 3574-3589.
- Tuzlalı, S., Güllüoğlu M., Çevikbaş U. (2014). *ROBBINS Temel Patoloji*. (9 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Uflacker, R. (2007). *Atlas of Vascular Anatomy: an Angiographic Approach*. (2nd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Urday, S., Kimberly, W. T., Beslow, L. A., Vortmeyer, A. O., Selim, M. H., Rosand, J., Simard, J. M., Sheth, K. N. (2015). Targeting secondary injury in intracerebral haemorrhage-perihaematoma oedema. *Nat Rev Neurol*, 11(2), 111-122.
- Uyar, F. A. (2009). Doğal İmmun Sistem: Erken İnflamatuvar Yanıtın Kontrolü. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22(3), 26-30.
- Vakili, A., Kataoka, H., & Plesnila, N. (2005). Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(8), 1012-1019.
- Verbalis, J. G., Goldsmith, S. R., Greenberg, A., Schrier, R. W., Sterns, R. H. (2007). Hyponatremia Treatment Guidelines 2007: Expert Panel Recommendations. *The American Journal of Medicine*, 120(11A), 1-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Veszélka, S., Kittel, Á., & Deli, M. A. (2011). Tools for modelling blood-brain barrier penetrability. In *Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug-Candidates* (pp. 166-188). Bentham Science Publishers Ltd.
- Vignali, D. A., Kuchroo, V. K. (2014). IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nature Immunology*, 13(8), 722-8.
- Wada, K., Tahara, A., Arai, Y., Aoki, M., Tomura, Y., Tsukada, J., & Yatsu, T. (2002). Effect of the vasopressin receptor antagonist conivaptan in rats with heart failure following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*, 450(2), 169-177.
- Walcott, B. P., Kahle, K. T., & Simard, J. M. (2012). Novel treatment targets for cerebral edema. *Neurotherapeutics*, 9(1), 65-72.
- Walz, W., & Hertz, L. (1984). Sodium transport in astrocytes. *J Neurosci Res*, 11(3), 231-239.
- Wang-Fischer Y., & McCool J. (2009). *Administration of Substances and Sampling*. In Wang-Fischer Y. (Ed.), *Manual of Stroke Models in Rats* (pp. 275-303). Boca Raton: US.
- Wang, H., Czura, C. J., Tracey, K. J. (2003). *The Cytokine Handbook*. (4. Basım). Thomson, A. W., Lotze, M. T. (Ed.). Londra: Elsevier.
- Weed, L. H. (1914). Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. III : The pathways of escape from the Subarachnoid Spaces with particular reference to the Arachnoid Villi. *J Med Res*, 31(1), 51-91.
- Witt, K. A., & Sandoval, K. E. (2014). Steroids and the blood-brain barrier: therapeutic implications. *Adv Pharmacol*, 71, 361-390.
- World Health Organization (WHO). "The top 10 causes of death"
Erişim: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Wykes, V., & Vindlacheruvu, R. (2015). Intracranial pressure, cerebral blood flow and brain oedema. *Surgery - Oxford International Edition*, 33(8), 355-362.
- Yakaryılmaz, F., Özden, A.(2009). Sirotik Hastalarda Hiponatreminin Patogenezi, Kliniği ve Tedavisi, *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 13(1), 48-55.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yan, Y., Dempsey, R. J., & Sun, D. (2001). Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporter in Rat Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(6), 711-721.
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., & Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*, 15(9), 1031-1037.
- Yeung, P. K., Lo, A. C., Leung, J. W., Chung, S. S., & Chung, S. K. (2009). Targeted overexpression of endothelin-1 in astrocytes leads to more severe cytotoxic brain edema and higher mortality. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(12), 1891-1902.
- Yilmaz, N. (2006). Kan-Beyin Bariyerinin Fizyopatolojisi. *Van Tıp Dergisi*, 13 (1), 25-27.
- Zaheer, S., Beg, M., Rizvi, I., Islam, N., Ullah, E., & Akhtar, N. (2013). Correlation between serum neuron specific enolase and functional neurological outcome in patients of acute ischemic stroke. *Ann Indian Acad Neurol*, 16(4), 504-508.
- Zeynalov, E., Jones, S. M., Seo, J. W., Snell, L. D., Elliott, J. P. (2015). Arginine-vasopressin receptor blocker conivaptan reduces brain edema and blood-brain barrier disruption after experimental stroke in mice, *PLoS ONE*, 10, 1-13.
- Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N.J., Aronowski, J. (2015a). Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage, *The Journal of Neuroscience*, 35(32), 11281-91.
- Zhao, X. Y., Wu, C. F., Yang, J., Gao, Y., Sun, F. J., Wang, D. X., Wang, C. H., Lin, B.C.(2015b). Effect of arginine vasopressin on the cortex edema in the ischemic stroke of Mongolian gerbils. *Neuropeptides*, 51, 55-62.
- del Zoppo, G. J. (2008). Virchow's Triad: The Vascular Basis of Cerebral Injury. *Reviews in neurological diseases*, 5(Suppl 1), S12-S21.
- del Zoppo, G. J. (2010). The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med*, 267(2), 156-171.

Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler:

- Adı-Soyadı : Betül CAN
- Doğum tarihi ve yeri : 04.08.1982, ANKARA
- Uyruğu : TC
- Medeni durumu : Bekar
- E-mail : betul_cn@yahoo.com

Eğitim Durumu :

- 2011-2017 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (Doktora)
- 2007-2010 : Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
- 2001-2007 : Hacettepe Üniversitesi
Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (Almanca)

Yabancı Dilleri :

- Almanca (iyi düzeyde)
- İngilizce (iyi düzeyde)