

**OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN BEYNİNDE POST-İSKEMİK REPERFÜZYON
HASARINA BAĞLI GELİŞEN KAN BEYİN BARIYERİ
GEÇİRGENLİĞİ VE ÖDEM ÜZERİNE U-74389G'NİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.KEMAL ERTİLAV**

**2002
ESKİŞEHİR**

Bu deneysel çalışma için Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dekanlığının 22 Ağustos 2001 tarih ve 152 sayılı kararı ile etik kurul izni
alınmıştır.

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ.DR. RAMAZAN DURMAZ

İÇİNDEKİLER

1. Özet.....	1
2. Giriş.....	4
3. Genel bilgiler.....	7
3.1. Fizyoloji.....	7
3.2. İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi.....	8
3.3. Kan beyin bariyeri ve vazojenik ödem.....	16
3.4. Na,K-ATPaz ve beyin ödemi.....	19
3.5. Ca,Mg-ATPaz ve beyin ödemi.....	21
3.6. Serbest radikaller ve reperfüzyon hasarı.....	22
3.6.1. Serbest radikallerin serebral vasküler endotel üzerine etkileri.....	22
3.6.2. Lazaroidler (21-Aminosteroidler).....	34
4. Araç, gereç ve yöntem.....	36
4.1. Deneysel prosedür.....	36
4.2. Biyokimyasal analizler.....	41
4.2.1. Ödem ve K.B.B. geçirgenliğinin değerlendirilmesi.....	41
4.2.1.1. Serebral dokuda ödem tayini.....	41
4.2.1.2. Serebral dokuda Evans Mavisı ekstrasvazyonu miktarının tayini... 41	
4.2.2. Beyin sinaptozomlarının hazırlanması.....	42
4.2.3. Membrana bağı ATPaz aktivitesinin ölçülmesi.....	42
5. İstatistiksel analizler.....	43
6. Bulgular.....	44
6.1. Her iki protokolde yer alan sıçanların ortalama kan gazı değerleri.....	44
6.1.1. K.B.B. geçirgenliği ve ödem grubuna ait kan gazı ortalama değerleri....	44
6.1.2. Na,K-ATPaz ve Ca,Mg-ATPaz aktivitesi çalışılan hayvan grubuna ait kan gazı değerleri.....	44
6.2. Serebral ödemle ilgili bulgular.....	45
6.3. Evans Mavisı ekstrasvazyonu (K.B.B. hasarı) bulguları.....	46
6.4. Sinaptozomal Na,K-ATPaz aktivitesiyle ilgili bulgular.....	50
6.5. Sinaptozomal Ca,Mg-ATPaz aktivitesiyle ilgili bulgular.....	52
6.6. Histopatolojik görüntüler.....	54
7. Tartışma.....	57
8. Sonuç.....	65
9. Kaynaklar.....	68

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, sıçan beyinde oluşturulan post-iskemik reperfüzyon hasarında, özellikle mikrovasküler endotelyumda lokalize olabilen U-74389G'nin premedikasyonunun Kan Beyin Bariyeri (KBB) geçirgenliği, doku su içeriği, sinaptosomal Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz aktivite değişiklikleri üzerine olan koruyucu etkinliğini araştırmaktır.

Metod: Post-iskemik reperfüzyon hasarı, 25 dakika süreyle oluşturulan global iskemiye takiben; 12 saat süren reperfüzyon ile sağlandı. İskemi, "Dört Damar Oklüzyon Modeli" (bilateral karotis+vertebral arter oklüzyonu) kullanılarak oluşturuldu. Deneyde Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar iki protokole ayrıldılar. Her iki protokolde yer alan hayvanlar ise dörder gruba ayrıldılar. Birinci gruptaki (kontrol grubu) hayvanlara sadece bilateral vertebral arter koagülasyonu yapıldı. İkinci grup, "iskemi grubu" olarak adlandırıldı ve bilateral vertebral arter oklüzyonundan sonra, bilateral karotid arterler kapatılarak; dört damar oklüzyonu yapıldı. Üçüncü grup

“ilaç grubu” olarak adlandırıldı ve sıçanlar, global iskemiden 15 dakika önce ve reperfüzyon başlangıcında 5 mg/kg dozunda iki kez U-74389G ile intraperitoneal olarak tedavi edildi. Dördüncü grup ise “çözücü grubu” idi ve 10 cc HCL (10 mg/kg U-74389G’yi çözen dozda) verildi.. Birinci gruptaki hayvanlar vertebral oklüzyon sonrası 24. saatte dekapite edilirken diğer üç gruptaki hayvanlar reperfüzyon sonrası 12. saatte % 2’lik 5 ml/kg Evans mavisi i.v. yolla verilerek bir saatlik sirkülasyon sonrasında dekapite edildi. Birinci protokoldeki sıçanların beyin dokularında, KBB geçirgenliği ve doku su içeriği değişiklikleri çalışıldı. İkinci protokolde yer alan sıçanlar ise, Evans mavisi verilmeksizin dekapite edilerek Na^+K^+ -ATPaz ve $Mg^{+2}Ca^{+2}$ -ATPaz aktiviteleri çalışıldı.

Bulgular: İskemiye takiben reperfüzyon beyin su içeriğinin % 3.6 artışına neden oldu ve bu artış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı idi ($p<0.001$). U-74389G; ödemi; kontrol grubu değerlerine yakın bir düzeye düşürdü ($p>0.05$). İskemi ve reperfüzyon, anlamlı şekilde Evans mavisi ekstrasvazyonuna neden oldu ($p<0.01$). U-74389G tedavisinin, KBB’ni koruduğu ve Evans mavisi ekstrasvazyonunu kontrol değerine yakın bir düzeye indirdiği görüldü ($p>0.05$).

İkinci protokoldeki sıçanlarda ise, iskemi grubunda, kontrol grubuna göre Na^+K^+ -ATPaz enzim aktivitesi % 42.11 azaldı ($p<0.01$). U-74389G, Na^+K^+ -ATPaz enzim aktivitesini kontrol değerlerine yakın değerlerde tuttu ($p>0.05$). $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz aktivitesindeki azalma % 65.7 idi ($p<0.001$) ve U-74389G enzim aktivitesini iskemi grubuna göre anlamlı derecede korudu ($p<0.01$).

Sonuç: U-74389G, iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı oluşan beyin ödemi ve kan-beyin bariyeri bozukluğu ile Na^+K^+ -ATPaz pompası aktivitesi üzerinde belirgin şekilde koruyucu etkinliğe sahip bulunmuştur. $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz aktivitesi üzerinde ise anlamlı koruyucu etkinliğe sahiptir. Bu olgu, serbest radikal hasarının ve lipid peroksidasyonunun iskemi-reperfüzyon hasarındaki önemini vurgulamaktadır ve U-74389G'nin bu hasarda serbest radikal bağlayıcı bir ajan olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir.

2. GİRİŞ

Beyin ödemi, beyin su içeriğinin artmasına bağlı olarak beyin dokusunun genişlemesi olarak tanımlanabilir. İskemi sonrası gelişen beyin ödeminin, hücre içi kalsiyum artışı, nötral proteazların aktive olması ve artmış serbest radikal üretimine bağlı lipid peroksidasyonu gibi ikincil olaylar sonucunda geliştiği düşünülmektedir. İskemiye bağlı ölümlerin neredeyse 1/3'ü, ikincil olaylar sonucu gelişen beyin ödemeine bağlı intrakranial basınç artışı (ICP) ve beyin herniasyonu nedeniyle olmaktadır (1).

Beyin ödemi tanımı, ilk defa Hipokrat tarafından, ödemli beyin su içerdiğinin belirtilmesiyle başlar. İkinci tanım, IX. yy'da Razi tarafından, travmatik beyin ödemi olarak yapılmıştır (2).

Klatzo (3), beyin ödemini nöropatolojik açıdan vazojenik ve sitotoksik olmak üzere ikiye ayırmıştır. Vazojenik beyin ödemi; KBB bütünlüğünün bozulmasına sekonder olarak su ve solütlerin ekstrasellüler alana geçmesine bağlı olarak beyin dokusunun şişmesidir. Sitotoksik ödem, daha çok astrositlerde olmak üzere nöronlarda ve hatta

aksonlarda gözlenen hücre içi sıvı içeriğinin artmasına bağlı hücresel şişmedir (3).

Vazojenik Beyin ödeminin daha çok beyin tümörlerinde, hematomlarda, travma ve inflamatuvar olaylarda ve iskemide olduğu düşünülür. Ödem, özellikle, beyaz cevherdedir. KBB bütünlüğünün hasarı sonucu oluşur. Sitotoksik ödem ise gri ve beyaz cevheri birlikte etkiler; ancak KBB bütünlüğü bozulmamıştır. Bununla birlikte, bu klinik durumlarda, sitotoksik ve vazojenik ödem birarada görülür (3).

Üçüncü bir ödem şekli ise interstisyel ödem olarak Fishman tarafından tanımlanmıştır; hidrosefalide, beyin omurilik sıvısı (BOS)'nın periventriküler dokuya doğru yaptığı basınç sonucu oluşur . Miller (1979), serebral ödem sınıflamasını genişleterek, ödem sıvısının farklı doku bölümlerinde birikmesini göz önüne almak suretiyle mevcut ödem tiplerine ek olarak hidrostatik ve hipoozmotik ödemi ilave etmiştir (10).

Beyin hücreleri, nöral membranların bir tarafından diğer tarafına iyonik dengeyi korumak için enerji kaynağına ihtiyaç duyarlar. İskemi, beyin hücrelerinin enerji kaynaklarını tüketir. Karmaşık moleküler olaylar sonucu, değişik mediatörler ve serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Enerjiye bağımlı hücre membranı iyonik pompaları (Na^+K^+ -ATPaz, $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz) iflas eder ve sitotoksik ödem gelişir. Serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu kapiller endotel

hücrelerinin membran bütünlüğü de bozularak vazojenik ödem meydana gelir. Vazojenik ödem oluşumunda asıl sebepler reperfüzyon süreciyle başlayan moleküler olaylara dayanır (3,4,5,6).

İskemi-reperfüzyon sonunda, serbest radikallerin serebral mikrovasküler yatakta neden olduğu hasarın serebral ödem gelişimine neden olduğu düşünüldüğünden; bu çalışmada, bir serbest reaktif oksijen radikali temizleyicisi ve lipid peroksidasyon inhibitörü olan U-74389G'nin; serebral ödem gelişimi, KBB hasarı oluşumu ve enerji bağımlı sinaptozomal Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz enzimlerinin aktivitelerine olan koruyucu etkisi araştırıldı.

İskemi ve reperfüzyonda "Dört Damar Oklüzyon Modeli" kullanıldı (7,8).

İskemiye bağlı ödemin teşhisi ve patofizyolojisini anlamadaki birçok gelişmeye rağmen, terapötik seçenekler sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, yeni tedavi protokollerinin ortaya konulmasında ve bunların klinik uygulamaya sokulabilmesinde deneysel çalışmaların değeri büyük olacaktır (1).

3.GENEL BİLGİLER

3.1.FIZYOLOJİ

Beyin, tüm vücut ağırlığının % 2'sini oluşturmasına rağmen, kardiyak kan akımının % 15'ini alırken, istirahatte inspire edilen oksijenin % 20'sini tüketmektedir. Normal fizyolojik şartlarda, 100 g beyin dokusu, 1 dakikada 3.5 ml (160 milimol) oksijen, 60 ml (30 milimol) glukoz tüketmekte olup, kandan alınan glukozun % 90'ı mitokondrial oksidatif fosforilasyon sırasında enerji kaynağı olarak kullanılırken, % 15 kadarı aneorobik yolla pirüvata dönüşmektedir. İskemide, enerji üretimi azalır ve bir mol glukozun anaerobik ortamda yıkılması birkaç mol ATP üretimi ile sonuçlanır. Pirüvat, laktata dönüştürülerek; hücre içi laktik asidoz gelişir. Bu sırada hücre içinde biriken laktat, hiperosmolar bir ortam yaratarak hücre içine su çekilmesine neden olur. Özellikle patolojik durumlarda, oldukça az miktardaki enerji kaynağı olarak depo halindeki glikojen ve yüksek enerjili fosfatlar (ATP, fosfocreatinine, glisin vb.) yanında aminoasitlere

ve keton cisimlerine de başvurulmaktadır. (9,10).

Nöronların işlevsel durumu, oksijen ve glukoz dağıtımı için yeterli beyin kan akımı (CBF) olup olmadığına bağlıdır. Serebral kan akımı 20 ml/100gram/dakikanın altına düştüğünde serebral iskemi süreci başlar. Serebral kan akımı % 50'ye kadar azaldığında; fizyolojik olarak kompanse edilebilir durumdadır; ancak, % 50- % 20 arasında azaldığı takdirde asidozis ve ödem gelişir. Takiben, K^+Ca^{+2} değişimi ve protein sentezi sonlanır. Bunun yanında, hücrenin elektriksel uyarılabilirliği sona erer ve enerji bağımlı iyon değişimi yapılamaz. Üst iskemik eşikte (20 ml/100 gram beyin dokusu/dakika beyin kan akımı), hücreler, nöronal işlevleri ve elektriksel aktiviteyi yapamasa da morfolojik bütünlüğünü korur. Alt iskemik eşikteki CBF (% 15 ve altı)'de ise, ATP miktarının azalması ile hücre zarı ve mitokondrial fonksiyonlarda zayıflama oluşur. Bu akış eşğinde geri dönüşsüz hücre hasarı başlamaktadır. Bununla birlikte, bu iki eşik arasındaki mesafe oldukça az olabilir (11).

3.2.İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ FİZYOPATOLOJİSİ

İskemi, fokal veya global olabilir. Gelişen fizyopatolojik olaylar, vazojenik ödemin global iskemide daha belirgin olması dışında her iki tipte de aynıdır. İskemik bölgenin merkezinde olayın ilk anından itibaren mutlak doku nekrozu ve hücre ölümü söz konusudur. Böylece, vasküler

oklüzyon ile birlikte bölgedeki hücrelerde (nöron, glia, endotel) zincirleme birçok fizyopatolojik olay, bir kısmı birlikte, bir kısmı da birbirini izleyecek şekilde başlayacaktır (Tablo I) (10,13,14).

Tablo I. Strokta gelişen fizyopatolojik değişiklikler

-
- . ATP yetmezliğine bağlı iyon pompaları çalışamaz hale gelir.
 - . Hücre membranı depolarize olur.
 - . Hücre içine Na^+ ve Cl^- girişi, hücre dışına K^+ çıkışı artar.
 - . Adenozun miktarı artar. ATP/ADP oranı azalır.
 - . Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır.
 - . Eksitator aminoasit (glutamat, aspartat vb) salınması hızlanır.
 - . Endojen opiatların miktarı artar.
 - . Anaerobik solunum ve hücre içi asidoz gelişir. NMDA (N-metil-d-aspartat) reseptörlerine bağlı Ca^{+2} kanalları açılır.
 - . AMPA (Kainate/Quisqualate) reseptörleri aktive olur.
 - . Endotel mediyatörlerinin salınması aşırılaşır.
 - . Likit enzimler aktive olur.
-

Global iskemide, 15-20 saniye içinde oksijen, glukoz, glikojen, fosfokreatin, glisin ve ATP azalması ile birlikte CO_2 birikimiyle mitokondrial fosforilasyon durur. Beyin hücrelerinin enerji substratları bitince, Na^+ -ATPaz, Ca^{++} - H^+ , Na^+ - K^+ değişimi pompaları çalışamaz hale gelir. Na^+ ve Cl^- hücre içine girerken, K^+ hücre dışına çıkar ve giriş kanalları kapanır. Depolarizasyon sonrası voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları açılır ve hücre içine Ca^{++} iyonları girmeye başlar. Hücre, bu fazla Ca^{++} iyonlarını dışarı atmaya çalışır. Bu sırada, her bir Ca^{++} iyonuna karşılık 2H^+ iyonu hücreye girer. Bu şekilde, hücre içi pH azalır. Ayrıca, hücre içi laktat birikimi, intrasellüler asidozu daha da artırır. Gerek Na^+ iyonu ile birlikte hücre içine giren,

su moleküllerindeki artış, hücreyi sitotoksik ödeme götürür . İlk dakikalarda başlayan bu ödem, iskemiye takiben 12 ila 16 saatte maksimal düzeye ulaşır ve en erken kapiller endotel hücrelerinde görülür (1,6).

Yağ asitlerinin açıl kökünün mitokondrial membrandan geçişini karnitin sağlar. Dolayısıyla, karnitin, normal şartlarda serbest yağ asitlerinin mitokondrial β -oksidasyonları için gereklidir. Böylece, oluşan Asetil CoA'nın krebs siklusuna girişi gerçekleşir. Serebrovasküler olay sonucu oluşan plazma ve sitoplazma karnitin eksikliğine bağlı yağ asitlerinin oksidasyonu aksayacak, hücre dışında açıl CoA artarken hücre içinde Asetil CoA azalacak ve krebs siklusunun ihtiyacı olan Asetil CoA, glukozun anaerobik yol ile kullanılmasının hızlandırılması ile sağlanmaya çalışılarak piruvatın laktat yönüne kayması ile hücrede laktik asit birikimi daha da artacaktır (10,14).

Presinaptik membranda eksitator nörotransmitter maddelerden özellikle glutamat ve aspartat miktarı artmakta ve bu moleküller, post-sinaptik hızlı NMDA (N-metil-D-Aspartat) ve yavaş Kainate ve Quisqualate (AMPA= α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoxasole propiyonat) reseptörlerini stimule etmektedirler. NMDA reseptör aktivasyonu reseptöre bağlı Ca^{++} kanallarını açarken, AMPA reseptörleri ise Na^+ kanallarını açar. Bu sırada fazla miktarda salgılanmış

olan endojen opiatlar, eksitatör transmitter artışını provoke edici etki gösterirler. NMDA reseptör aktivasyonu, hücre membranındaki G-proteinini aktive ederek reseptöre bağlı Ca^{++} kanallarını açarken, G-proteini, ayrıca, fosfolipaz C enzimini de aktive eder. Bu enzim, polifosfoinozid'lerden (PPI) olan fosfotidil inozitol difosfat (PIP2)'ı parçalayıp inozitol trifosfat (IP3) ve diaçil gliserol (DAG)'un oluşmasını sağlar. IP3, sitoplazmik retikulumdaki kalsiyumun sitoplazmaya geçerek serbestleşmesine neden olurken, DAG ise protein kinaz C (PKC) enzimini aktive eder. Protein Kinaz C, nükleusta gen ekspresyonu ve mRNA transkripsiyonuna yol açar. Normal şartlarda olmayıp, hipertermi, hipoksi, hipoglisemi ve bunun gibi stresör etkili durumlarda oluşan bu genlerin koruyucu proteinler sentezleyerek, dokuyu stroke sonucu oluşabilecek zararlardan ve nekrozdan korudukları açıklanmıştır. Yapılan çalışmalarda, serebrovasküler olaya duyarlı nöronlarda bu genlerin daha az düzeyde oluştuğu gösterilmiştir. Diğer taraftan, mitokondrial oksidatif fosforilasyon bozulunca, yıkıcı enzimlerin sentezi ve aktivasyonu da artmaktadır. Her 3 yolla da hücre içinde artmış olan kalsiyum, inaktif halde bulunan hücre içi litik enzimleri aktive ederek hücrenin yapı elemanlarının yıkılımını başlatmaktadır. Litik enzimlerden fosfolipaz A2'nin aktivasyonu ile lipid peroksidasyonu başlamakta ve membran fosfolipitlerinden birisi olan araşidonik asit, eikosonoidlere

parçalanmaktadır. 5-lipooksijenaz enziminin aktivasyonu ile lökotrienler, siklooksijenaz enziminin aktive olması ile de prostanoidler oluşmaktadır. Endotel hücrelerinden oluşan prostanoidler, prostosiklin (PGI₂) ve diğer prostoglandinler (PG E₂, PGF_{2α}), trombositlerden oluşan tromboksan A₂ (TXA₂)'dir. Lökotrienler, platelet aktive edici faktör (PAF) aktivasyonu, geçirgenlik artışı ve lökositlere kemotaktik etki gösterirler. Lökotrien C₄, kapiller geçirgenliği çok güçlü olarak bozucu etkiye sahiptir. Prostasiklin, mikrosirkülasyon düzeyinde dilatasyon ve anti-agregan etki gösterirken, TXA₂ ve PG'ler vazokonstrüksiyon, kapiller geçirgenlik artışı ve trombosit agregasyonunu artırıcı etkiye neden olurlar. Proteaz ve endoperoksidaz enzimlerinin aktivasyonu ile protein dekarboksilasyonu artmakta ve hücrenin temel yapı taşı olan protein yıkımı başlamaktadır. Ornitin dekarboksilaz enzim aktivasyonu ile ornitinin metabolizması bozular ve mediatör olarak oluşan putressin fazlalığı, kalsiyumun reseptöre bağlı kanallardan hücre içine girişini artırır (5,6,13,14).

Serebrovasküler olayın etkisiyle damar endoteli etkilenince, subendotelyal kollajen açığa çıkar ve trombositler kollajene yapışırlar. Trombositlerin yapışması, protrombinin trombine dönüşmesini ve PAF'ın salgılanmasını sağlar. Trombin, fibrinojenin fibrine dönüşmesine, PAF ise trombositlerin aktivasyonuna yol

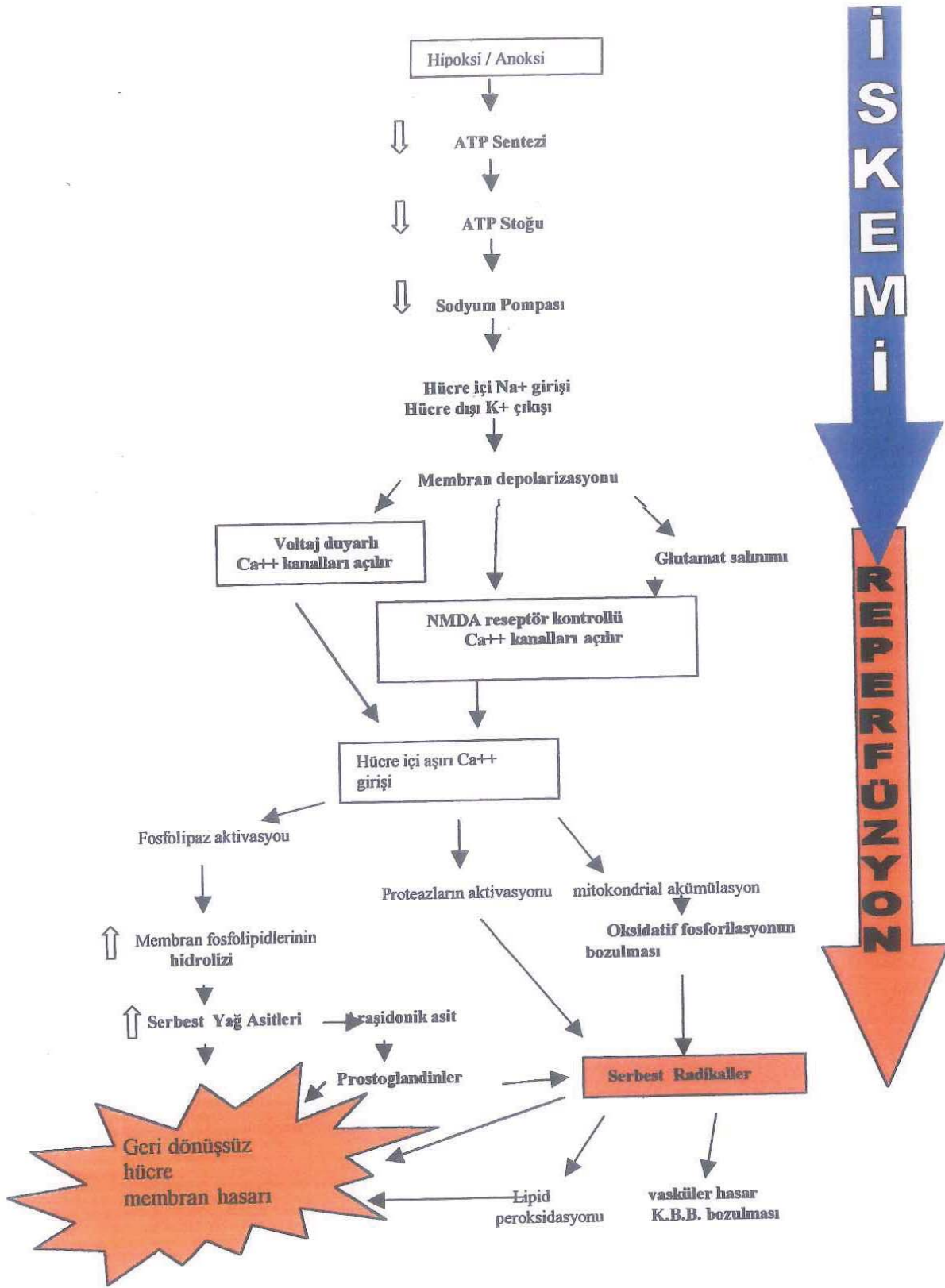
açar. Aktive olmuş trombositler, bu sırada ortamda artmış olan ADP'nin de etkilemesiyle agregasyon olurken tromboksan A₂, serotonin, histamin gibi birçok madde salgırlar. Fibrin, agregasyon olmuş trombositlerle birlikte trombusu oluşturur (5,14).

Nöronal doku hücrelerinde olduğu gibi damar endotelinde de aynı fizyopatolojik olaylar gelişir. Platelet aktive edici faktör (PAF), doku plazminojen aktivatörü (tPA), sitokinler (interlökinler, interferonlar, tümör nekroz faktörleri, nörotrofik büyüme faktörleri, lipokortin), trombin, hücre adezyon molekülleri (integrinler, selektinler, immünoglobulinler), fibronektin, EDRF (NO=nitrik oksit) ve EDCF (endotelden salınan konstriktör faktör veya endotelin-1)'nin salgılanması olur. NO'nun artışı ile asetil kolin, bradikinin ve kısmen sitokinler artmaya başlar. Uygun dozdaki sitokinler, inflamasyon, rejenerasyon ve deafferantasyon gibi reaksiyonlar için faydalı olurlarken aşırı dozlarda zararlı olurlar (5,6,10).

Gelişen tüm bu metabolik reaksiyonlar sırasında serbest oksijen radikallerinin lezyon yerindeki düzeyleri artacak ve bu artış, vücudun doğal endojen anti-oksidan savunma moleküllerinin yetersiz kalmaları sonucu regüle edilemeyecektir. Yıkıcı özellikte olan bu partiküller, hem başka zararlı metabolik işlemleri tetikleyecek hem de litik enzimlerin başlattığı yıkımı hızlandıracaktır. Hızlanan bu olaylar, zaten artmış olan

serbest radikallerin daha da artmasına, dolayısıyla nekrozun yayılması yönünde bir kısır döngünün oluşmasına yol açacaklardır. Normal ve sağlıklı şartlarda, vücut savunması için belirli bir düzeyde olduğu takdirde yararlı ve gerekli olan serbest radikallerin aşırı miktarlarda bulunması hücre nekrozunun artması ve yayılması yanında kapiller geçirgenliğin bozulmasında ve böylece, makromoleküller ve proteinlerin plazmadan interstisyel kompartmana su ile birlikte geçerek vazojenik beyin ödeminin oluşmasına büyük ölçüde katkıda bulunacaktır (Şekil I) (5,6,10).

Beyin ödeminde, serbest radikallerin yanında sitokinlerin, opiatların ve histaminin de rolü olduğu belirtilmektedir. Sonuçta, iskemi-reperfüzyon hasarında sitotoksik ve vazojenik ödem oluşmakta ve bu ödem, şiddetine ve süresine bağlı olarak, stroke'lu hastaların 1/3ünün ölmesinde önemli etkenlerden biri olabilmektedir(10,13).



Şekil 1. İskemik reperfüzyon hasarı. Doku hasarının iki komponenti aşırı nörolojik hasara yol açar. İskemik komponent, iskemi sırasındaki doku hasarının süreçlerini içerir. Bu sırada oluşan hücre ölümü iskeminin süresi ve şiddetine bağlıdır. Reperfüzyon olduğu anda meydana gelen biyokimyasal değişiklikler sekonder hasarı belirler (Leslie N.M., M.R. Weglinski; Pathophysiology of metabolic brain injury. Anesthesia and Neurosurgery, 1994).

3.3. KAN BEYİN BARIYERİ VE VAZOJENİK ÖDEM

Beyin mikrovasküler endotelial hücreleri, birbiriyle sıkı bağlantılarla (zonula occludens) kompleks bir devamlılık göstererek KBB'ni oluşturmaktadırlar. Gerçekte KBB; vasküler kapillerin, astrosit ayakları, perisit, düz kas hücreleri ve nötrofillerle sarılarak oluşturduğu dinamik bir yapıdır. Serebral endotel, tartışmasız şekilde büyük ve polar moleküllere geçirgen olmamasına rağmen, birçok yağda çözünür maddeye hayli geçirgendir. İyonlar, küçük nonelektrolitler ve üreye ise değişik geçirgenlik sergiler (15,16).

Serebral endotel hücreleri, diğer dokulara göre daha az pinositik oluklar ve veziküller içerir. Bu KBB'nin önemli bir özelliğidir. Vazojenik ödemde stimüle edilen pinositik aktivite, interstisyel boşluğa serum proteini transportunda önemli bir mekanizma olarak gözükmektedir (17).

Beynin birçok hastalığında, farklı ve az anlaşılmış hücresel mekanizmaların kısmi olarak işe karışmasıyla, KBB bütünlüğü etkilenir. KBB'nin hasarlandığı her hastalıkta netice serebral ödemdir. Araşidonat, eikasanoidler, bradikinin ve serbest radikallerin, KBB hasarına neden olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Patolojik dokudan salınan bu mediatörler, sitozolik Ca^{+2} seviyesini değiştirerek KBB'de değişmeye neden olan ikincil haberci sistemi indükleyebilirler (78).

KBB'nin gelişmesinde ve bariyer fonksiyonunun kuvvetlenmesinde astrositlerin rolü büyüktür. Bazı tümörler ve iskemide, intrinsik ve yeni oluşan kapillerlerde KBB karakteristiğinin olmaması ve hücre kültüründe üretilen endotel hücrelerinin birkaç pasajdan sonra KBB özelliklerini kaybedip ortama astrosit eklenmesiyle KBB özelliklerini tekrar kazanmaları bunu destekler (18,19,78).

İskemi-reperfüzyon hasarında, kapiller endotelinde, hücre içi Ca^{+2} artımıyla ve eksitotoksik glutamat ve serbest yağ asitlerinin birikimiyle oluşan reaktif oksijen radikalleri, KBB'nin bütünlüğünü bozmaktadır. Aynı şekilde, iskemiye takiben gözlenen laktik asidozis ve pH düşüklüğü de mikroveziküler transport sistemi üzerinden KBB bütünlüğünü bozmaktadır. Sitotoksik ödeme yol açan metabolik olaylar zinciri; endotel hasarına, plazma proteinlerinin ekstravazasyonuna ve vazojenik ödeme yönelebilmektedir (20,21,78).

Plazma proteinlerinin ekstravazasyonu; değişen sıkı bağlantılardan diffüzyon, sıvı faz indüksiyonu veya nonspesifik pinositozis ve transitozis, transendotelial kanalların formasyonu veya endotelial membran yayılması yollarından biri veya birkaçıyla gerçekleşebilir (51).

Vazojenik beyin ödeminde, KBB hasarını gösterirken plazmadan beyne sızan, protein moleküllerine bağlanan Evans mavisi kullanılmaktadır (24).

Vazojenik beyin ödemi sıvısındaki ekstrasellüler glutamat konsantrasyonunun normal değerlerin on katına çıktığı bulunmuştur. Glutamat reseptör blokerlerinin, hipokampal CA sektör nöronları koruması ve NO'un neden olduğu ödemi azaltması; Glutamat ve NO'in KBB hasarına neden olduğunu önermektedir (26,27).

Dört damar oklüzyon metodu kullanılarak oluşturulan iskemi-reperfüzyonda, 45. dakikada, ışık mikroskopisi ve elektron mikroskopisi temelinde, KBB bütünlüğünün bozulduğu kanıtlanmıştır (22).

Eksitatörler aminoasitlerin salınmasıyla oluşan proteazlar, vasküler endotel etrafındaki ekstrasellüler matrikse saldırır. Nötral proteazların iki familyası Matriks metalloproteinler (MMP) ve plazminojen aktivatörleridir. Matriks metalloproteinler, çinko ihtiva eden ekstrasellüler matriksin bileşenlerinin bir gen familyasıdır. Endotelial bazal lamina ,Tip IV kollajenaz AB, stromeksin ve metrisynleri de içeren gen familyasının bazı hücreleri tarafından hidrolize edilir. Gelatinaz A'nın serebral parankime enjeksiyonu KBB'yi açmıştır. Reperfüzyon öncesi oklüzyon süresi ne kadar uzarsa KBB bütünlüğü o kadar erken bozulmaktadır. Orta serebral arter oklüzyonu sonrası ilk KBB açılımı 3.

saatte jelatinaz A piki ve 24-48 saat sonra ikinci KBB açılımı jelatinaz B piki ile olmaktadır. (22,28,29,30).

3.4. Na^+K^+ -ATPaz ve BEYİN ÖDEMİ

Beyin dokusu, nöronal olmayan hücrelerin ATPaz'ı ve aksolemmal ATPaz olmak üzere iki ayrı formda Na^+K^+ -ATPaz enzimi içerir. Enzim; 90600 moleküler ağırlıklı geniş α -subünitine ve glikoprotein yapıda olan küçük bir β -subünitine sahiptir. α -subünit katalitik alanı içerirken β -subünitin enzimin uygun lokalizasyonunu sağladığı ve plazma membranında halo enzim montajında gerekli olduğu düşünülmüştür. Enzim, Mg^{+2} ve Na^+ varlığında fosforile olurken K^+ varlığında defosforile olur (31).

Na^+K^+ -ATPaz, beyin endotelial hücrelerinin tüm yüzeylerinde lokalizedir. Yapılan araştırmalar, Na^+K^+ -ATPazın asıl olarak KBB endotelial hücrelerinin abluminal membranında lokalize olduğunu; ancak, aktivitesinin % 25'inin luminal tarafta gerçekleştiğini göstermektedir (33).

Enzim, hem nöronlarda hem de glial hücrelerde 2K^+ 'u hücre içine taşıırken, 3Na^+ 'u hücre dışına atar. Sinir dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunan enzim, iyonik dengenin regülasyonunu ve dolayısıyla hücre sel ozmotik basıncın belli sınırlar içerisinde devam ettirilmesini sağlar (32).

Biyolojik amin nörotransmitterlerin geri alımında yer alan bir enzim olan Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi ölçülerek, stres altındaki nöronal aktivitedeki karışıklığın derecesi değerlendirilebilir (39).

Çeşitli deneysel modellerle oluşturulan beyin ödeminde; Na^+ ve K^+ ile beyin su muhtevası arasında direk bir ilişki gözlenmiştir. Bu veriler, mitokondrial ATP sentezi azlığına bağlı olarak Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin azalmasıyla açıklanmıştır (34,35).

Sağ karotis ligasyonlu gerbil ön beyinde, iskemi sonrası 6. saatte Na^+K^+ -ATPaz hasarı görülmüştür. Bilateral iskemi ve reperfüzyon sonrası, gerbil ön beyindeki bölgesel Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin azalması, ödeme hassas olduğu belirtilen striatum, talamus, hipokampus ve frontal kortekste ortaya çıkmıştır. Öncül araştırmacılar, resirkülasyon sonrası ve pentobarbital ile tedaviye alınan gerbillerde, enzim aktivitesinin, bilateral karotis ligasyonu sonrası düştüğünü gördüler. Daha kapsamlı bir çalışmada, Mc Millian ve ark. (37), normoglisemik, normotansif sıçanlarda Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin primer iskemide sabit kaldığını; ancak reperfüzyon sonrası düştüğünü buldular. Na^+K^+ -ATPaz aktivitesindeki bu azalma, membran fosfolipidlerinin disorganizasyonu ile izah edilebilir. İskemi-reperfüzyon hasarında, serbest oksijen radikallerine bağlı geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz enzim aktivite düşüşünün ortaya çıktığını gösteren çalışmalar da bu izahı

desteklemektedir (31,32,36,37,38,81).

Vazojenik ödem oluşumunda, Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin kaybolması ya da inhibe olması, iskeminin indüklediği lipid peroksidasyonunun en erken sonuçlarından biridir. Bu nedenle, serebral serbest yağ içeriğindeki artışlar, Na^+K^+ -ATPaz düşüklüğünü açıklayabilmektedir (40).

3.5. $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz ve BEYİN ÖDEMİ

İntraselüler serbest kalsiyum dengesi, nöronların fonksiyonları için gereklidir ve bozulmuş kalsiyum dengesi, geç nöronal ölümle sonuçlanır (74). İntraselüler kalsiyum artışının, geç nöronal ölüme önemli rol oynadığı bilinmesine rağmen, ekstraselüler kalsiyum birikiminin de gecikmiş nöronal ölüme katkısı bulunmaktadır (75). Sarkoplazmik retikulumdaki intraselüler depolar bu mekanizmada yer alırlar (72). Frandsen (71) ve Zhang (70, 1993), sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum akışını inhibe eden dandroleni kullanarak, hipokampal bölgedeki nöronal ölümün önlenemediğini gösterdiler. Bu çalışmalara rağmen, iskeminin doğrudan sarkoplazmik retikuluma olan etkisi ispatlanamamıştır (49). $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz, hücre içi Ca^{+2} ve Mg^{+2} konsantrasyonunu dengede tutar (69). İskemi, doğrudan $\text{Mg}^{+2}\text{Ca}^{+2}$ -ATPaz'ı etkileyebilir. İskemi sırasında, enzime kalsiyum bağlanmasındaki affinite azalmıştır (68). Sonuçta,

kalsiyumun hücre dışına taşınmasındaki azalma ve nöronal bazal kalsiyum seviyesinde artış vardır (75). Protein kinazlar, birçok nöronal fonksiyonu ve sekonder mesajcı sistemleri devam ettirirler. Özellikle Ca^{+2} , Calmodulin-bağımlı protein kinaz II (CAM kinaz II), nöron fonksiyonunda önemli rol oynar . CAM kinaz II, sarkoplazmik retikulumda $Mg^{+2}\backslash Ca^{+2}$ -ATPaz enzimini aktive ve fosforile eder. İskemide ve gecikmiş nöronal ölümdede, CAM kinaz II inhibe olur (75). Sonuç olarak, iskeminin indüklediği bu inhibisyon, $Mg^{+2}\backslash Ca^{+2}$ -ATPaz fosforilasyonunu azaltır ve kalsiyumun geri alınımı azalmış olur. Neticede, intraselüler ve ekstraselüler Ca^{+2} düzeyleri arasında bir denge vardır ve $Mg^{+2}\backslash Ca^{+2}$ -ATPaz'ın hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun sabit tutulmasında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (75).

3.6. SERBEST RADİKALLER VE REPERFÜZYON HASARI

3.6.1.SERBEST RADİKALLERİN SEREBRAL VASKÜLER ENDOTEL ÜZERİNE ETKİLERİ

Serbest radikaller, basitçe, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren moleküllerdir. Bu nedenle serbest radikal molekülleri kimyasal olarak unstabil ve reaktiftirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenin radikal türevleridir; bunlar, süperoksit (O_2^-), bir ara ürün olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH)

radikalleridir (9).

Süperoksit dismutaz (SOD), α - tokoferol, askorbik asit, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon gibi enzimatik ve nonenzimatik savunma mekanizmaları, serbest radikalleri detoksifiye ederek sekonder beyin hasarının azaltılması yanında, serebral vasküler hasarın önlenmesinde çaba sarfetmektedirler (50).

Lipid peroksidasyonu, reaktif O_2 türlerinin membran yapısındaki poli doymamış yağ asitlerinin (PUFA) α - metil grubundan H^+ atomu çıkarması ve su oluşturması ile başlar. PUFA içeren bu lipidler, vücudumuzda bulunan membranların ana komponentidirler. Poli doymamış yağ asitlerinde lipid radikallerinin oluşumu, özellikle, demir metali ile katalize edilir. Vücudumuzdaki demir, genellikle membranlar ve demir taşıyıcı proteinlerle korunduğundan reaksiyona giremez. Denatürasyon sonrası taşıyıcı proteinlerden kurtulan demir, uygun maddelerle şelat oluşturursa, biyomembranlardaki PUFA'larla reaksiyona girebilir. Membrandaki elektron transport sistemi demiri indirger ve böylece metal aracılı kataliz gerçekleşir. Demir bağlantılı kataliz, lipid peroksidasyonunun başlaması ve ilerlemesinde en önemli olaydır (46).

Canlı organizmadaki en aktif radikal, hidroksil ($OH\cdot$) radikalidir.

Biyojenik sistemlerde, hidroksil radikalinin major kaynağı

süperoksit radikali ve hidrojen peroksidin demir ile reaksiyona girdiği Haber Weiss reaksiyonudur (9,41,42).

Normal şartlarda, süperoksit radikali, hücrel metabolizmanın değişen bir ürünüdür. Enzimatik reaksiyonlarla ve elektron transferiyle oluşur. Endoplazmik membranlara bağlı sitokromlar, O_2^- üretebilirler. Hücre membranlarındaki NADPH oksidaz ile nötrofiller de önemli süperoksit radikal kaynağıdır. Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon sırasında da ürik asit oluşurken O_2^- meydana gelebilir. Ayrıca, araşidonik asit metabolitlerinin sentezi ve katekolamin oksidasyonu sırasında da O_2^- oluşmaktadır.(41,44).

Hidrojen peroksit, O_2^- in bir elektron almasıyla oluşur. Bu reaksiyon, normalde hücrede spontan olarak oluşur ve süperoksit dismutazla (SOD) katalizlenerek katalaz enzimi ile H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür (41).

Sonuçta, oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR), aşırı üretim ya da yetersiz detoksifikasyona bağlı olarak;

1. Yapısal ve enzimatik proteinlerde denatürasyon ve peptid bağ hasarı,
2. Nörotransmitter fonksiyon bozukluğu,
3. Genom yapısında hücre harabiyeti ya da

kansere gidebilen mutasyonlar,

4. Membran fosfolipidlerinin peroksidasyonuna bağlı hücre yapım ve fonksiyonunda bozukluklar oluşturmaktadır.

İnsan vücudu temelde lipid, protein ve karbohidratlardan oluşmakta iken insan beyninin kuru ağırlığının % 50'sini lipidler oluşturur. Lipidlerdeki alkil zincirleri polariteye sahip olmadığından ve lipidler in vivo inaktif olduklarından yaşayan hücrelerin temel yapı taşlarından birisidir. Plazma membranı ve intrasellüler mikro-organel membranlarının lipid molekülü tabakasından oluştuğu iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, doymamış yağ asitlerinde görülen çift bağ hayli reaktiftir ve hidrojen ve diğer atomlarla birleşip oksidan harekete maruz kalması mümkündür. Lipidler, oksijenle birleştikten sonra peroksit halini alırlar. Biyomembran içerisinde oksijen, doymamış yağ asitinin $-CH_2$ 'si ile birleşirse bu bölgenin polaritesi ve dolayısıyla reaktivitesi artar ve bu alan hem daha hidrofilik hem de kimyasal açıdan daha aktif hale gelir. Böylece ya membran fonksiyonları bozulur ya da membran yapısında değişimler gözlenir (48,56).

Lipid içeren hücre ve organel membranları, hücre yapısı için temel yapılardır ve lipid peroksidasyonuna aşırı duyarlıdır. Diğer taraftan, oksijen moleküllerinin lipid affinitesi yüksektir; çünkü oksijen doğal halinde non-polar bir moleküldür. Bazı durumlarda, özellikle lipid

peroksidasyonunda, biyolojik mebranlar non-spesifik olarak oksijen molekülünü yakalarlar. Peroksidasyon, lipid bariyerin bütünlüğünü bozar ve membran permeabilitesini artırır. Mitokondrial oksidatif fosforilizasyon için gereken iyon akışı bozulur. Ayrıca, lizozomal enzimler salınarak hücreyi yıkıma götürür.

Serbest radikal türlerinin biyomembranlar üzerindeki harabiyeti, beyin ödemi ve geri dönüşümsüz iskemik beyin hasarından sorumlu tutulmaktadır. Diğer taraftan, O₂ aktivasyonu post-iskemik lipid peroksidasyonunun başlaması için mutlaka gereklidir.

Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri, serebral iskemi ve travmada membran fosfolipidlerini lipid peroksidasyonuna uğratarak membran yıkılımına neden olur; çünkü serebral kapiller endotel bünyesinde bol miktarda poli-doymamış yağ asidi bulunur. Serbest radikallerin, spinal kordtaki vasküler geçirgenlik değişikliklerini de tetiklediği bilinmektedir. Geçirgenlikte değişime neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemesine rağmen vasküler membranların serbest radikallerin indüklediği peroksidatif hasara karşı hassas olmaları suçlanmaktadır (73,76).

Beyinde, ksantin oksidaz ve dehidrogenaz içeren tek hücre türü vasküler endotel hücreleridir. Ayrıca, serebral dokuda mitokondri açısından en zengin hücreler de vasküler endotel hücreleridir. Normalde

hipoksantin, ksantin dehidrogenazla ksantin ve ürik aside metabolize olur. İskemide, mitokondrial oksidatif fosforilizasyon ve ATP seviyesinde düşme olur. AMP seviyesi artar. AMP; adenozin, inozin ve hipoksantine metabolize olur. İskemi derinleştikçe, hücre içi Ca^{+2} artışı proteolitik ve fosfolipaz enzimlerinin aktivasyonuna neden olur. Ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüştüğü Ca^{+2} bağımlı proteolitik dönüşüm, nükleotid radikalinin yerine reperfüzyonla gelen oksijeni kullanır ve süperoksit radikali (O_2^-) oluşur (Şekil II) . Ksantin oksidaz inhibitörü olan oksipurinol, kapiller endotel hücrelerinin (KEH) travmatik hasarını, doza bağımlı olarak azaltmıştır . Bu sonuç, KBB hasarında ksantin oksidaz kaynaklı O_2 ve H_2O_2 'nin rol aldığını gösterir. Zira, ksantin oksidaz yoluyla ortaya çıkan H_2O_2 'nin glutatyon peroksidaz ve katalazla suya dismutasyonu söz konusudur. Eğer bu enzimler ile tüketilemezse, Fe^{+3} katalizli “Fenton reaksiyonu” devreye girerek H_2O_2 ve OH^- radikali üretilecektir (51,54,55).

Süperoksit radikaller, *invivo* şartlarda anyon kanalları yoluyla ekstrasellüler alana geçerler ve anyon kanal inhibisyonu bunu önlemektedir. Deneysel çalışmalarda, SOD'ın beyin ödemi önlediği bildirilmesine rağmen, O_2^- 'lerin vazojenik ödem gelişiminde doğrudan etkisi olmadığına inanılmaktadır. Süperoksitle demirin reaksiyonu sonucu oluşan OH^- ise KBB'nin yıkılmasından sorumlu çok reaktif bir

radikaldır. Desferrioksaminle vazogenik beyin ödeminin önlenmesi ve mevcut ortama Fe^{+2} eklenmesiyle ödemin artması bu hipotezi desteklemektedir (60,61,62).

Geçmişte, beyin kesitlerinin kullanıldığı in vitro çalışmalarda, hücre hasarı ve ödem oluşumunun ksantin oksidaz/hipoksantin/ADP- Fe^{+3} ile tetiklendiği gösterilmiştir. Hücre hasarı, intraselüler sodyum ve laktik asit miktarının artışı ile birlikte intraselüler potasyum içeriğinde düşüşle karakterizedir. Dahası, membran fosfolipidleri yıkılır ve serbest yağ asidi salınımı ile lipid peroksidasyonunda artışlar gözlenir. Serbest poli doymamış yağ asidi birikiminin, beyin ödeminin ilerleyişinde güçlü bir etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Bu veriler, oksijen serbest radikallerinin membran bütünlüğünü bozduğunu ileri sürmektedir.

Ksantin oksidaz- Fe^{+3} infüzyonundan iki saat sonra hem serebral sodyum hem de serebral su içeriğinde değişimler gözlenirken potasyum içeriğinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Hasarlı serebrum bölgesinde, süngerimsi değişiklikler ortaya çıkarken nöron morfolojisindeki değişiklikler hücre hasarını göstermiştir. İnfüzyon yapılan alanda, Evans mavisi ekstravazasyonuna rastlanmıştır. Kan Beyin Bariyeri geçirgenliğindeki bu değişimler vazojenik ödeme özgüdür.

Ödem, 24-48 saatte maksimum değerine ulaşırken 1-2 haftada

yavaş yavaş çözülür. 24 saat ve sonrasındaki dönemde, Evans mavisini ekstrasvazasyonu ya çok azdı ya da hiç gözlenmemiştir. Bu nedenle, endotelial hücre hasarının, erken dönemde oksijen serbest radikalleri tarafından ortaya çıkarıldığı düşünülmektedir. Serebral mikrovasküler yataktan florescein işaretli dekstranın ekstrasvazasyonu, süperoksit dismutaz ile inhibe edilmiştir ki bu olgu, oksijen serbest radikallerinin geçirgenlik değişiminde rol oynadığını açıkça göstermektedir. Oksijen serbest radikallerinin aksiyon mekanizmaları tam olarak bilinmemesine rağmen, bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, kapiller endotel hücrelerinin önemli birer hedef olduğu ileri sürülebilir. Kapiller endotel fosfolipidleri, oksijen serbest radikallerinin neden olduğu peroksidasyon ve yıkıma karşı hayli hassas olup yukarıdaki verileri destekler niteliktedir; ancak serbest radikallerin doğrudan kapiller endotelini etkileyip etkilemediği ile ilgili soruları cevaplayamamaktadır.

Serebral vasküler endotel hücreleri ile oluşturulan in vitro KBB modelinde, "Menadione" (O_2^- üretimine neden olan K3 vitamini), transgenik farelerden üretilen (fazla miktarda CuZn ve SOD içeren) KEH'de, nontransgenik farelere göre 1,7 kat fazla O_2^- üretimine neden olmuştur. Ancak; veriler, vasküler hasara daha ziyade OH^- radikal ve peroksinitritin ($ONOO^-$) neden olduğunu göstermiştir. Anoksi, KEH'lerinde OH^- ve nitrikoksit üretimine neden olur. Nitrik oksit,

vasküler tonus üzerinde düzenleyici etkisi olan bir vazodilatördür. Vazodilatör, nörotransmitter ve sitokin olarak tanımlanır. NO^- , L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) denilen bir grup enzimce üretilir. NO^- radikali, O_2^- ile reaksiyona girerek ONOO^- yi oluşturur. Peroksinitrit ve NO^- lökosit adezyonunu önlediğinden bir noktaya kadar NO koruyucudur denebilir. NO ile O_2^- etkileşmesi, OH^- ve NO_2^- radikalinin üretildiği başka bir reaksiyonlar zincirini başlatır (50,57,58,59,63,64,65,66).

Travmaya maruz bırakılan sıçanlarda, domuz endotelial hücre (KEH) kültürlerinde, glutatyonun lezyon şiddetiyle paralel olarak tüketilmesi ve dışardan eklenen glutatyonun hücre hasarını önlemesi, serbest radikallerin, KBB hasarında rol aldığını göstermektedir. İskemik ve travmatik beyinde, SOD aktivasyonu, OH^- ve O_2^- üretimi ilk dakikalarda maksimal seviyeye ulaşmaktadır. KBB geçirgenliğinin travmayı takiben ilk bir saatte maksimal seviyeye ulaşması, serbest radikaller ve vasküler hasar arası eş zamanlı etkileşimi akla getirmektedir (51,52,53).

Deneysel iskemi ve reperfüzyon modelinde; beyinde, erken dönemde glutatyonun tüketildiği, bunun yanı sıra SOD aktivitesinin pik yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca oksipurinol, aynı şekilde anoksi ve reoksijenasyona maruz kalan domuz KEH'lerinde O_2^- üretimini ve hücre

hasarını önlemiştir (9) .

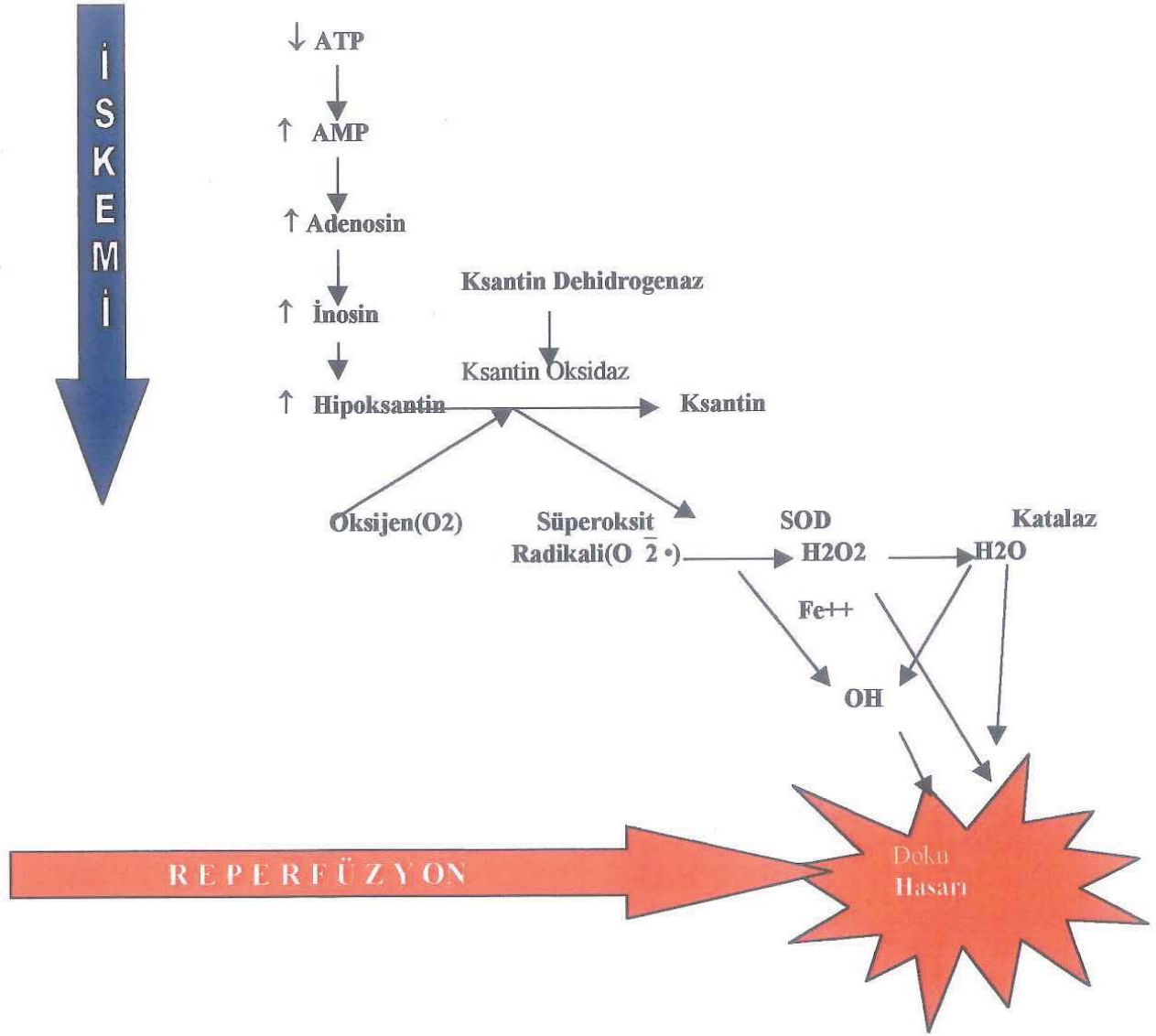
Netice olarak, serebral mikrovasküler endotel hücreleri yoğun lipid içeriği ve mitokondrial organel zenginliği ile iskemi-reperfüzyon hasarına karşı özellikle duyarlıdır ve iskemi sonrasındaki erken saatlerde serbest radikal aracılı KBB hasarı ve vazojenik beyin ödemi oluşumundan sorumlu olabilir.

Aynı iskemik atağa, beynin değişik bölgeleri farklı cevaplar vermektedir. Buna beyin hücrelerinin “seçici etkilenirliği” denir. İskemik hasara karşı özellikle hassas olan serebral bölgeler; limbik sistem, birincil olarak hipokampusun CA1 bölgesindeki piramit şekilli hücreler, purkinje hücreleri, küçük ve orta boylu striatal nöronlar ve korteksin 3,5,6 no’lu katmanlarıdır. Bu seçici etkilenirliğin sebebi olarak; özel nöroanatomik bağlantılar, sinaptik organizasyon ve zar özellikleri, nörotransmitter ve reseptör tipleri sorumlu tutulmuştur (12).

Sıvı perküsyonu ile oluşturulan kafa travmasında, vasküler hasar 6. saatte maksimum düzeydedir. Hasar sonrası 1-24 saatte korteks ve hipokampusu içeren hasarlı alanda asit fuksin ile boyanan nekrotik nöronlar gözlenir ve bu süreç 1-4 hafta devam eder. 1-24 saatte, erken demyelinizasyon bulguları gözlenmez. Hasar sonrası 24. saatte, asidofilik nöronlar tüm korteks katmanlarında görülebilir. 6-12 saat içerisinde nöronlarda şişme, kromatolizis, akson ve myelin kılıflarında

parçalanma, astrosit ve oligodendroglialarda kayıp izlenir. İskemi sonrası 24. saatte, polimorfonükleer lökositler, süngerimsi ödemli değişim alanını infiltre ederler. Makrofaj infiltrasyonu 2. haftada en yoğun düzeyine ulaşır. Daha sonra, makrofaj sayısı azalırken astrositler ve mikrogliaların sayısı artar. Sonuçta, glial nedbe dokusu oluşur. Mikroskopik olarak, 24-48 saatte, beyin ödemi en üst düzeydedir. Beyin ödemi artışıyla korele şekilde hücre içi sodyum içeriği de artmıştır (76,77,113).

Histopatolojik etkilenmenin derecesi reperfüzyon öncesi iskeminin süresiyle yakından ilişkilidir. İskemi süresi uzadıkça geri dönüşümsüz hücre hasarı artar. Ksantin oksidaz/hipoksantin/ADP ve Fe^{+3} infuzyonundan 2 saat sonra, serebral hemisfer su içeriği artmaktadır. 24-48 saatte, serbest radikal hasarına bağlı ödem oluşumu en üst düzeydedir (23,25).



Şekil II. Reperfüzyon ve reoksijenizasyondan sonra iskemik dokulardaki serbest radikal üretim mekanizması. İskeminin ortaya çıkmasıyla ATP, adenin nükleotidlerine ve hemen sonra da hipoksantin birikimine neden olan pürin bazlarına metabolize olur. İskemi sırasında, ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüştürülür. Reperfüzyon ve oksijenizasyon sırasında hipoksantin, hipoksantin oksidaz ile ksantine dönüştürülür ki bu da son ürün olarak süperoksit radikallerini üretir. İskemi sırasında salınan ferröz demiri kullanarak süperoksit radikalleri, fenton reaksiyonunda daha yüksek reaktiviteye sahip olan hidroksil radikallerine dönüştürülür. Serbest radikaller geri dönüşümsüz doku hasarına yol açan hücre₃₃ membranı yıkımını gerçekleştirir.

3.6.2. LAZAROİDLER (21-AMİNOSTEROİDLER)

Lazaroidler (21-amminosteroid), lipid peroksidasyonunu inhibe etmek için tasarlanmış non-glukokortikoidlerin yeni bir üyesidir. Özellikle, santral sinir sisteminin akut iskemisi ve travmasının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmişlerdir (121).

Bu bileşikler, çeşitli mekanizmalar üzerinden işlev görürler; pirimidin tabanlı olanlar, lipid peroksil radikallerini tutarak lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedirler. Ayrıca, bazılarının serebral parankime penetre olabilme özellikleri bulunmaktadır. Piridin tabanlı olanlar, vitamin E benzeri aktivitelerine ek olarak, demiri de bağlayarak serbest radikal türevlerinin oluşumunu engeller. Ayrıca, lazaroidlerin hücre membranını stabilize etme özellikleriyle etkilerini ortaya koydukları ve hasarlanmış hücrelerden araşidonik asit salınımını bloke ettikleri rapor edilmiştir (121,122).

Lazaroidlerin, plazma membranını stabilize etme ve serbest radikalleri tutma yetenekleri lipid yıkılımını engelleyerek, nöral dokuyu serbest radikal hasarına karşı koruyarak ortaya çıkmaktadır. Lazaroidlerin, nöral dokuyu koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (122,47,67).

Bir piridin kökenli bileşik olan U-74389G, özellikle, mikrovasküler endotele etki gösteren bir lazaroid bileşimidir. Ancak; beyin parenkimine geçmediği düşünülmektedir.

U-74389G'nin, İskemi-reperfüzyon hasarındaki anti-oksidan, lipid peroksidasyonunu önleyici ve nöroprotektif özellikleri çalışılmıştır. Bu çalışmada; reaktif oksijen ürünlerinin iskemi ve reperfüzyonu takiben ilk dakikalarda maksimal düzeye ulaştığı bilindiğinden; U-74389G, hem iskemiden 15 dakika önce hem de reperfüzyon başlangıcında verilerek post-iskemik reperfüzyonun neden olduğu ödem ve KBB hasarı üzerindeki etkinliği araştırıldı.

4. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada her biri 250-320 g ağırlığında olan 61 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi TİCAM Hayvan laboratuvarından temin edildi .

4.1. DENEYSEL PROSEDÜR

Deney, iki protokol halinde yürütüldü:

Protokol 1'deki 28 adet sıçan, ıslak-kuru ağırlık ölçümüne dayalı serebral ödem şiddetini ve Evans mavisi ekstravazasyonunu spektrofotometrik olarak ölçmeye dayanan KBB bozukluğunun derecesini belirlemek için kullanıldı. Protokol 2'deki 33 adet sıçan ise Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, biyokimyasal olarak Na^+K^+ -ATPaz ve $Ca^{+2} Mg^{+2}$ -ATPaz düzeyi ölçümü için kullanıldı.

Her iki protokoldeki sıçanlara Ketamin Hidroklorid (60 mg/kg) ve Xylazin (12 mg/kg) karışımının i.p. verilmesiyle anestezi sağlandı. Ketamin ve Xylazin karışımıyla i.p. olarak uyutulan sıçanların başları pron konumunda çivili baş sabitleyiciyle tespit edildi. Mikroskop altında; suboccipital ve paravertebral adaleler künt diseksiyonla

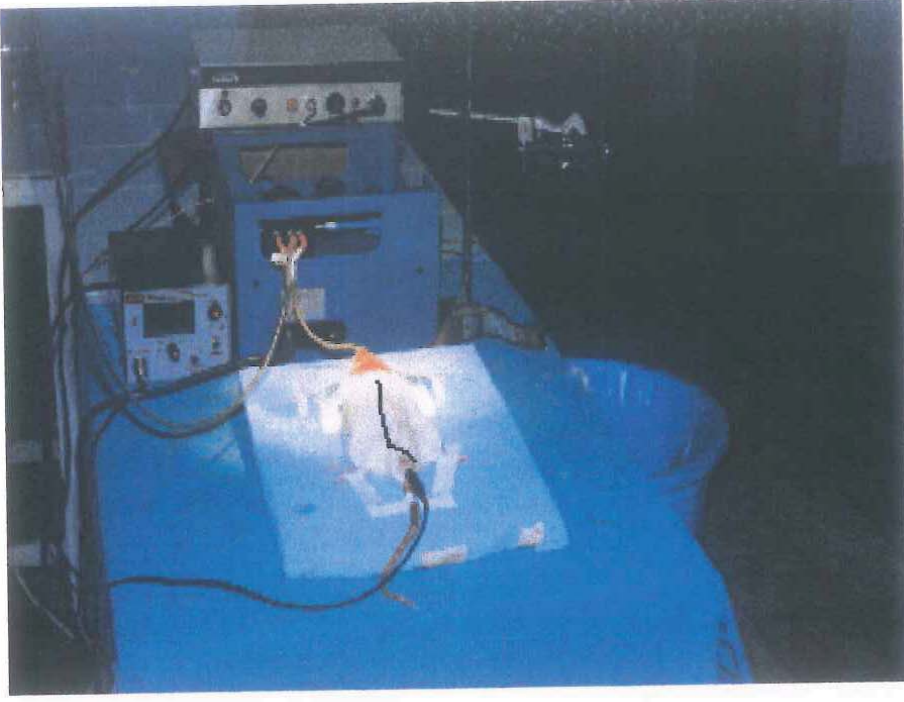
sıyrılarak ,C1 servikal vertebra laminası üzerindeki alar foramenler bulundu. Sonra elektrokoter (Petaş, Petkot 60) yardımıyla alar foramen içinden geçen vertebral arterler bilateral olarak koagüle edildi. Sıçanlar, kanama kontrolü sonrası yara kapatılarak yeme içme serbest kalacak şekilde kafeslerine bırakıldılar. Sıçanlar, 24 saat sonra aynı anestezi ajanlarıyla uyutularak 14 no'lu anjio kateteriyle endotrakeal entübe edildiler. Bu kez supin konumda pozisyon verilerek ventilatöre bağlandılar. Sol kalpten PPD iğnesi ile alınan heparinli arteriyel kan PCO₂ değeri 30-40 mmHg olacak şekilde mekanik solunum hızı ayarlandı. Rektal ısı, otomatik ısı ayarlayıcı yardımıyla 37 °C ye yakın bir sıcaklıkta muhafaza edildi.

Boyun, antiseptik (batticon) solüsyonla hazırlandıktan sonra vertikal insizyonla açıldı. Mikroskop altında karotis arterleri bilateral ortaya konularak nervus vagustan dikkatli şekilde disseke edildi. Bilateral karotid arterler anevrizma klipleriyle 25 dakika süreyle oklüde edildi. Klipler açılarak reperfüzyon sağlandı (7,8) (Şekil 3,4,5,6).

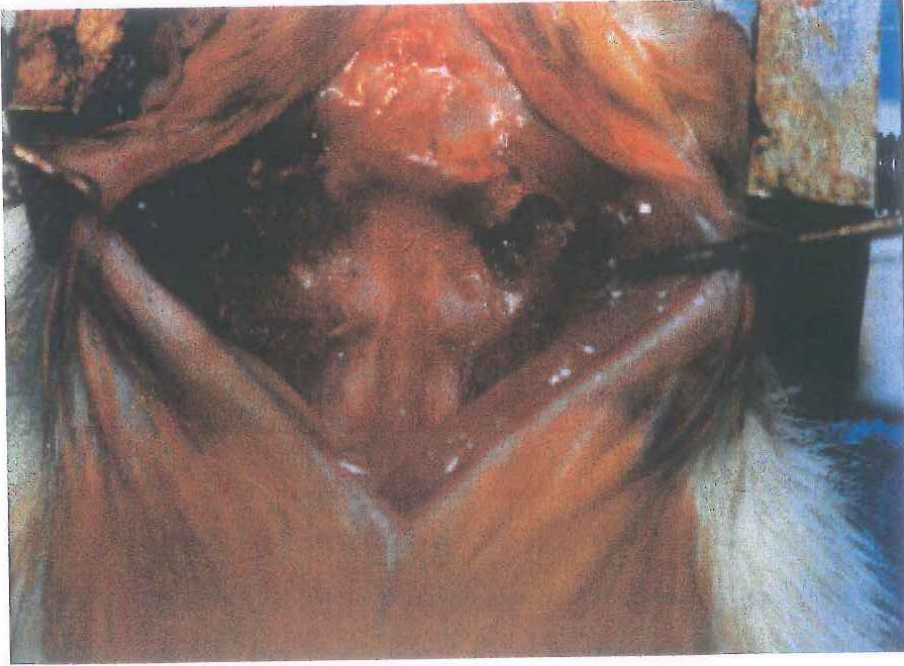
Birinci protokole ait ilaç grubundaki 7 sıçana, bilateral karotis arterleri klempajından 15 dakika önce 5 mg/kg U-74389G i.p olarak verildi. Takiben, bilateral karotis arterler, anevrizma klibiyle 25 dakika süre ile kapatıldı. Klipler açılarak reperfüzyon sağlandı. Bu sırada 5 mg/kg olacak şekilde i.p olarak ilaç tekrar verildi. Çözücü grubuna dahil

7 adet sıçana aynı şekilde karotis klempajından 15 dakika önce ve reperfüzyonla birlikte U-74389G'nin çözücüsü (10 milimolar konsantrasyonlu) HCl (0.5 cc) i.p olarak verildi. Reperfüzyon sonrası anestezinin hafiflemesiyle beraber solunumu güçlenen sıçanlar, ekstübe edilerek yeme içme serbest olacak şekilde kafeslerine alındılar. İskemi grubuna dahil olan sıçanlar da aynı şekilde bilateral karotis klempajına tabi tutuldular. 12 saat sonra aynı şekilde uyutulan sıçanlar, sağ femoral venden kateterize edilerek % 2'lik 5 ml/kg dozda Evans mavisi ile işlem gördüler. Bir saatlik Evans mavisi sirkülasyonunu takiben sıçanların göğüs kafesi açılarak kalbin sağ aurikulası kesildi. Sol ventrikülden 10 cmH₂O basınç altında 200 cc % 0,9'luk NaCl ile kardiyak perfüzyon yapılarak, beyin dokusu, kan elemanlarından temizlendi. Daha sonra dekapite edilen beyinler, serebral ödem şiddeti ve kan-beyin bariyeri hasarını belirlemek üzere -18 °C' de saklandılar. Kontrol grubuna dahil 7 adet sıçan ise bilateral arter koagülasyonunu takip eden 24. saatte aynı şekilde Evans mavisi uygulamasına tabi tutularak dekapite edildiler ve aynı çalışma için saklandılar.

Protokol 2'deki 33 adet sıçana da aynı işlemler aynı prosedürlerle uygulandı.; ancak Evans mavisi uygulanmadı. Sıçanların kardiyak perfüzyonu takiben hızlıca çıkartılan beyinleri, sıvı nitrojen içinde dondurularak -70 °C' de saklandılar.



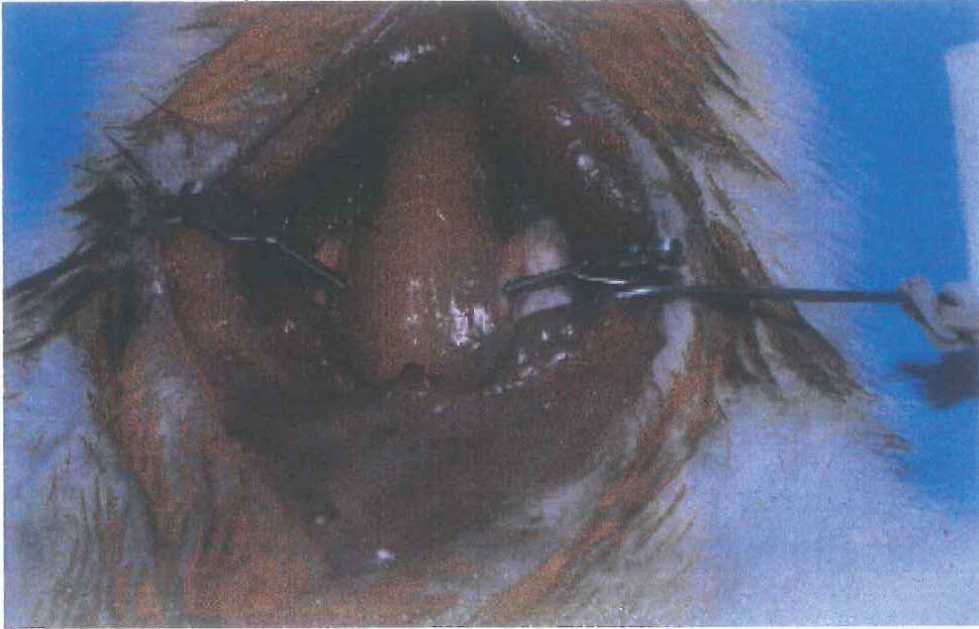
Şekil 3. Dört damar oklüzyon modeline ait deneysel çalışma düzenineğin görünümü



Şekil 4. C1 vertebra laminasına ait olup içinden vertebral arterlerin geçtiği alar foramenlerin görünümü



Şekil 5. Koagüle edilmiş vertebral arter ve alar foramene ait görünüm



Şekil 6. Bilateral karotis arter kliplenmesine ait görünüm

4.2.BİYOKİMYASAL ANALİZLER

4.2.1. ÖDEM ve KBB GEÇİRGENLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1.1. Serebral dokuda ödem tayini

İskemik beyindeki su muhtevası, yaş ağırlığın kuru ağırlığa oranı ile elde edildi. Serebral dokunun tamamı aliminyum folyo üzerinde tartıldı ve 24 saat süreyle 105 °C de kurutuldu. Sonra yeniden tartıldı. Suyun yüzdesi şu formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{H}_2\text{O} = \frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Yaş ağırlık}} \times 100 \quad (86)$$

4.2.1.2. Serebral dokuda Evans Mavisi Ekstravazasyon miktarının tayini

Kurutulmuş iskemik beyin dokusu % 50'lik triklor asetik asitin 2 ml'si içinde homojenize edildi (W/v) ve 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlardan 1 ml toplandı ve 3 ml etanol içinde dilue edildi. Evans mavisi bu hazırlanan dilue süpernatant

içinde spektrofotometre (Schmadzu UV-1201) kullanılarak 660 nm dalga boyunda ölçüldü (87). Sonuçlar; mikrogram/gram kuru ağırlık olarak ifade edildi.

4.2.2. BEYİN SİNAPTOZOMLARININ HAZIRLANMASI

Beyin 4°C' de eritildikten sonra sağ ve sol hemisfere ayrıldı. Sağ hemisferler Na^+K^+ -ATPaz, sol hemisferler $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz çalışılması için hazırlandı. Sinaptozomların hazırlanması, Braughler ve Hall'ın (88) daha önce spinal korda uyguladıkları metoda göre yapıldı. Örnekler tartıldıktan sonra, 9 hacim taze hazırlanmış homojenize edici tampon içinde (100 mM Tris HCl, pH-7.6, 330 mM sükröz ihtiva eden) 4 °C'de homojenize edildi. Homojenat, 1100 Xg de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen son süpernatant fraksiyonu, 18000 Xg de 15 dakika santrifüj edildi. Sinaptozomal tortu, 1 ml homojenize edici tampon içinde tekrar süspanse edildi ve hemen ölçüldü.

4.2.3. MEMBRANA BAĞLI ATPaz AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

Bu ölçüm, ATPaz tarafından yapılan ATP hidrolizisini, aşırı pirüvat kinaz (PK), laktat dehidrogenaz (LDH) ve fosfoenol pirüvat (PEP) varlığındaki NADH oksidasyonu ile bağlar. Böylece; 340 nm'de devamlı spektrofotometrik kayıtlama yapılmasına izin verir.

Na⁺K⁺-ATPaz aktiviteleri şu reaksiyon karışımında ölçüldü: 30 mM imidazol (pH 7.3), 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.5 M MgCl₂, 1 M Na 2ATP, 1 M PEP, 0.5 M NADH, 0.5 M etilen glukol-bis (B-amino etil eter)-N,N,N,N-tetra asetik asit, 1 Ü LDH, 1 Ü PK ve sırasıyla 1 M oubainle beraber ve oubainsiz olarak ölçüldü.

Ca⁺² \ Mg⁺²-ATPaz aktivitesi için 1 M oubain varlığında 0.5 M CaCl₂ eklendi. Enzimlerin aktiviteleri, 2-5 µl sinaptozomal membran süspansiyonunun eklenmesi ile stimüle edildi. NADH oksidasyonu ,37 °C sıcaklıkta, 340 nm.'de 10-15 dakika için her 30 saniyede bir absorbansın ölçülmesiyle monitorize edildi ve ünit/mg protein olarak ifade edildi (89).

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Grup değerleri arasındaki farklılık; tek yönlü varyans analizini takiben tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak araştırıldı. P<0.05, anlamlı olarak kabul edildi. (Motulsky 1994-1995,90).

Bütün sonuçlar "ortalama değer ± ortalamanın standart hatası" şeklinde ifade edildi.

6. BULGULAR

6.1. HER İKİ PROTOKOLDE YER ALAN SIÇANLARIN ORTALAMA KAN GAZI DEĞERLERİ

İskemiden önce sol kalbe girilerek alınan kan gazlarının ortalama değerleri tablo halinde aşağıda gösterilmiştir.

6.1.1. KBB GEÇİRGENLİĞİ VE ÖDEM GRUBUNA AİT KAN GAZI DEĞERLERİ

GRUP	PO ₂ Ort.±Std. Hata	PCO ₂ Ort±Std. Hata
KONTROL	128,9±17,35	36,17±1,70
İSKEMİ	128,65±27,59	35,50±1,79
İLAC (U74389G)	124,91±37,94	36,34±2,04
ÇÖZÜCÜ	131,07±30,11	36,72±1,44

6.1.2. NA⁺K⁺-ATPAZ VE Ca⁺²Mg⁺²-ATPaz AKTİVİTESİ ÇALIŞILAN HAYVAN GRUBUNA AİT KAN GAZI DEĞERLERİ

GRUP	PO ₂ Ort.±Std. Hata	PCO ₂ Ort±Std. Hata
KONTROL	131,98±14,47	35,96±1,87
İSKEMİ	128,88±13,18	36,98±1,80
İLAC (U74389G)	133,63±10,50	37,48±1,92
ÇÖZÜCÜ	124,81±13,10	36,96±1,49

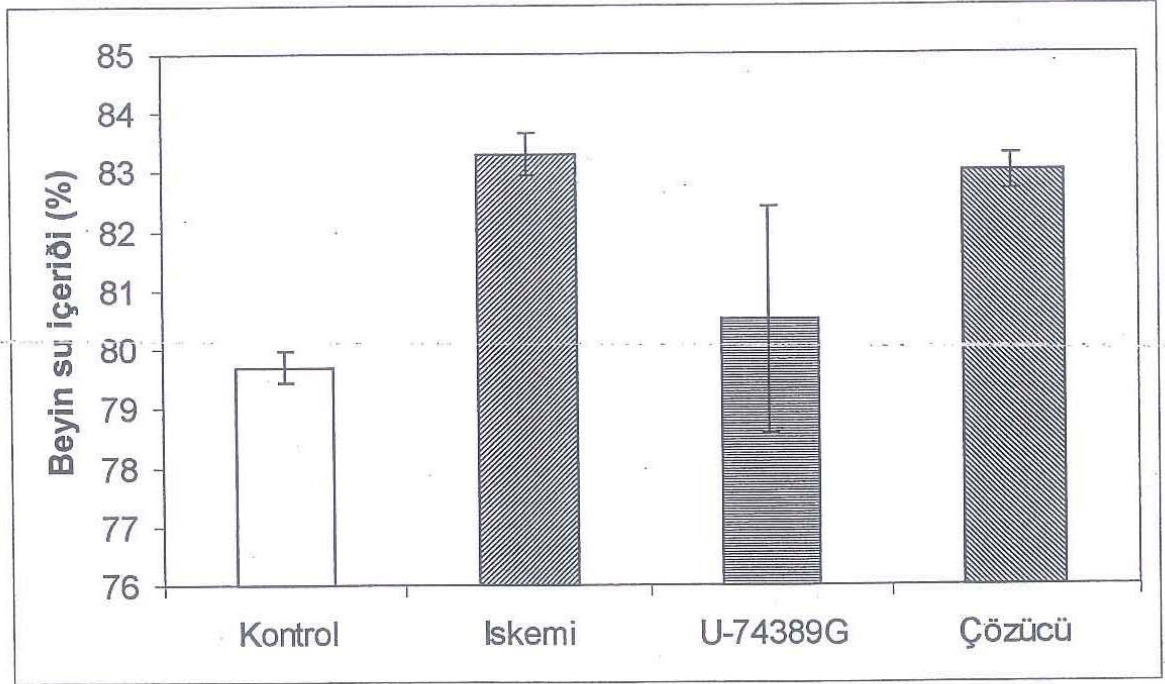
Yukarıda görüldüğü üzere arteriyel kan gazı ortalama değerleri PCO₂= 30-40 mmHg, PO₂= 100 mmHg'nin üzerinde olacak şekilde ventilasyon sayıları ayarlanmıştır.

6.2.SEREBRAL ÖDEMLE İLGİLİ BULGULAR :

İskemi - reperfüzyon sonrası 12. saatte dekapite edilen sıçan beyinleri, ıslak – kuru ağırlık metoduna göre değerlendirildi.

GRUBU	ORTALAMA DEĞER	STANDART HATA
Kontrol (n=7)	79,7	± 0,26
İskemi (n:7)	83,3	± 0,36
U-74389G (n:7)	80,5	± 1,9
Çözücü (n:7)	83	± 0,3

Tablo 1 : Beyin dokusu su muhtevası ortalama değerleri (%)



Grafik 1 : Beyin dokusu su muhtevası ortalama değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi (% H₂O)

İskemi ve reperfüzyon.; beyin su içeriğini % 3.6 artırdı. Bu artış; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı idi ($p < 0,001$). Çözücü grubundaki ödem ile iskemi ve reperfüzyon grubunun içerdiği

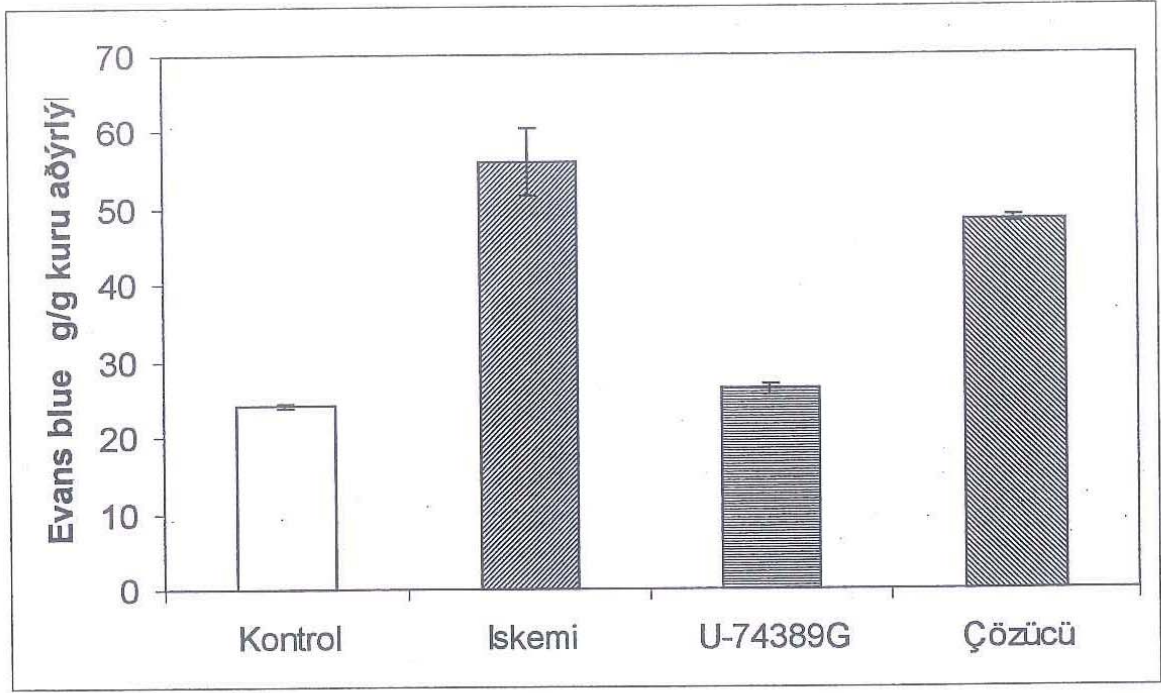
ödem arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Ancak; ödem, U-74389G ile tedavi edilen sıçanlarda çözücü verilen grup ile karşılaştırıldığında çok anlamlı şekilde azaldı ($p<0,001$) ve kontrol grubundan farklılık göstermedi ($p>0,05$).

6.3. EVANS MAVİSİ EKSTRAVAZASYONU (KBB HASARI) BULGULARI

Reperfüzyon sonrası 12. saatte dekapite edilen sıçanların beyinlerinde spektrofotometrik olarak Evans mavisi tutulumu ölçüldü (Tablo 2, Grafik 2). Ayrıca; Evans mavisinin sıçan beynindeki ekstrevasasyonu morfolojik olarak Şekil 7,8,9'da gösterildi.

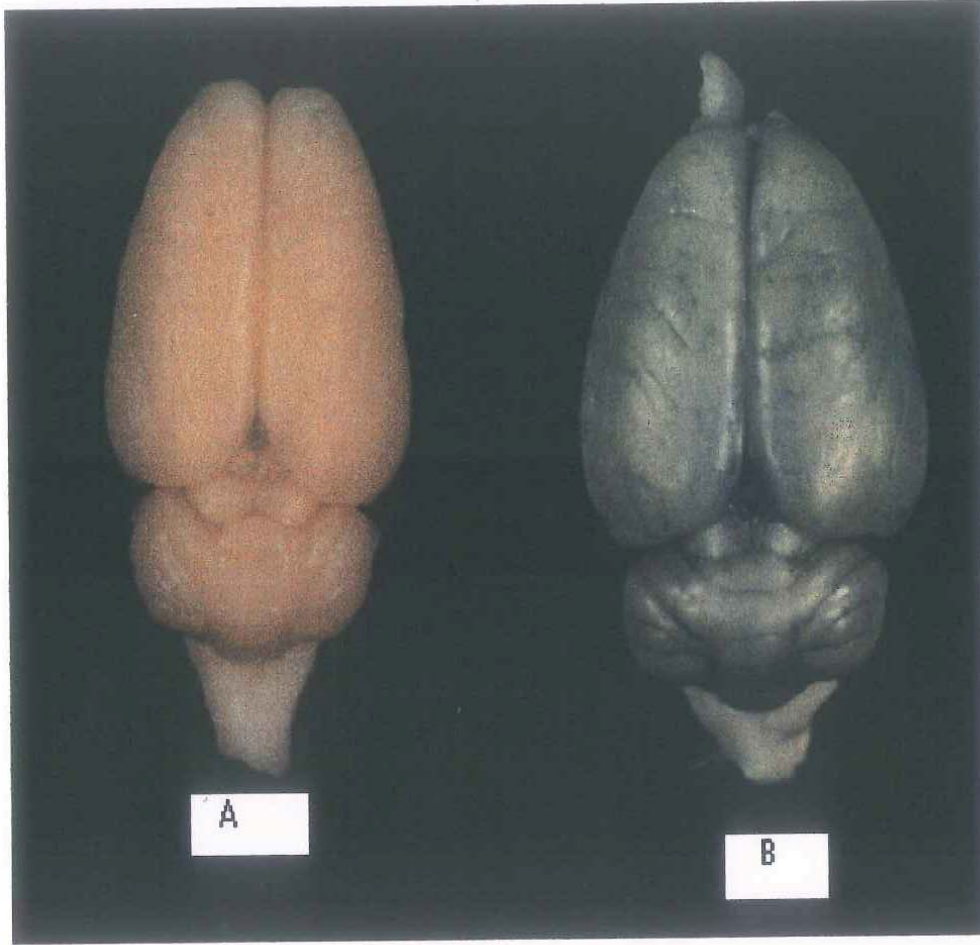
GRUBU	ORTALAMA DEĞER	STANDART HATA
Kontrol (n:7)	24,23	$\pm 0,26$
İskemi (n:7)	56,01	$\pm 4,3$
U-74389G (n:7)	26,25	$\pm 0,75$
Çözücü (n:7)	48,44	$\pm 0,36$

Tablo 2: Beyin dokusu Evans Mavisi ekstrevasasyonu ortalama değerleri ($\mu\text{gr/gr}$ kuru ağırlık)

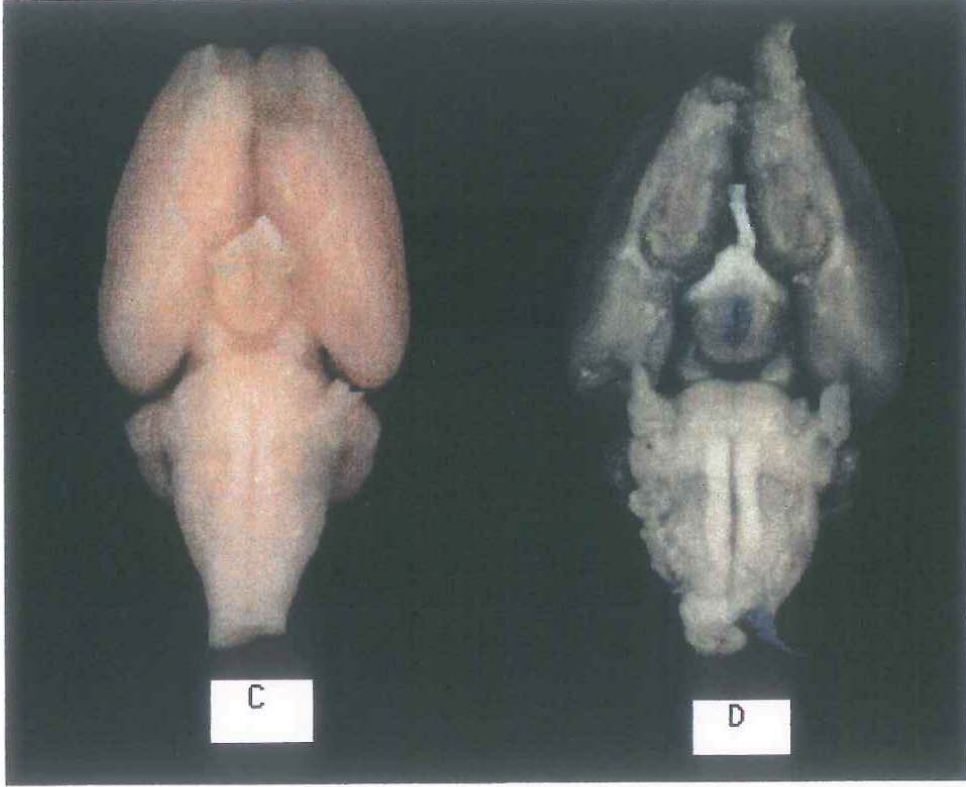


Grafik 2 : Beyin dokusu Evans Mavisi ekstravazasyonu ortalama değerlerinin grafiksel gösterilmesi ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ kuru ağırlık)

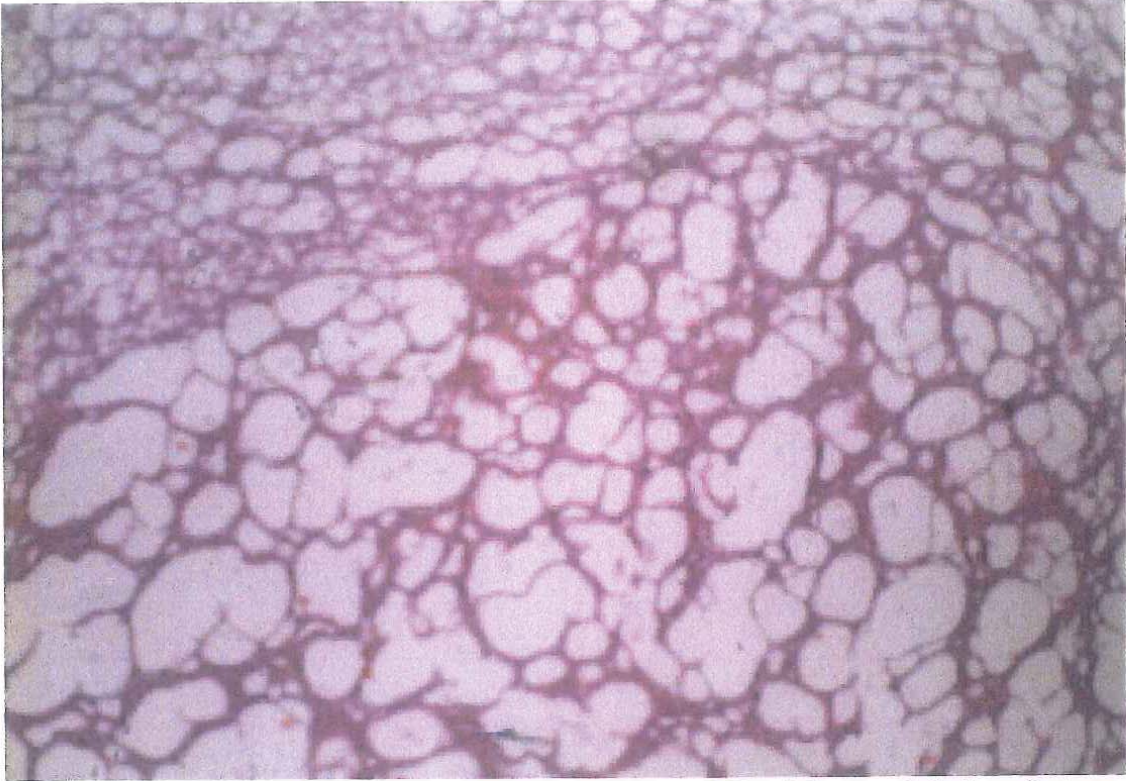
İskemi ve reperfüzyonda, Evans mavisi ekstravazasyonu kontrolün 2,3 katı idi ($p < 0.001$). U-74389G, KBB geçirgenliğini korudu ve Evans mavisi geçişini kontrol değerine yakın bir düzeye indirdi ($p > 0.05$). İskemi grubuyla çözücü grubu arasında anlamlı fark bulunmadı. ($p > 0,05$).



Şekil 6 (Üstten görünüş): Normal sıçan beyni makroskopik görünümü (A). Kan beyin bariyeri hasarına bağlı sıçan beynindeki Evans mavisi ekstravazasyonu (B).



Şekil 7 (alttan görünüş): Normal sıçan beyni makroskopik görünümü (C). Kan beyin bariyeri hasarına bağlı sıçan beynindeki Evans mavisi ekstravazasyonu (D).



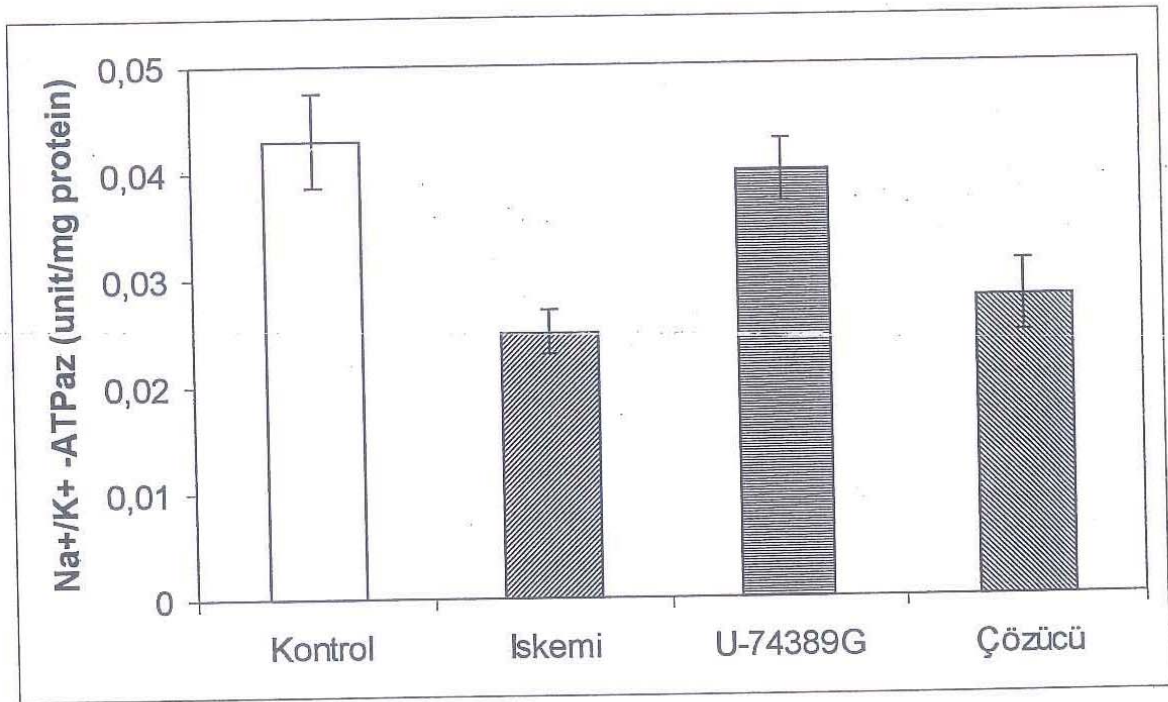
Şekil 8: KBB hasarına bağlı Evans Mavisi geçişini gösteren mikroskopik görüntü. Geniş likefaksiyon nekrozu izlenmektedir. (Hematoksilen Eosin, x100)

6.4. SİNAPTOZOMAL Na^+K^+ -ATPaz AKTİVİTESİYLE İLGİLİ BULGULAR :

Reperfüzyon sonrası 12. saatte dekapite edilerek sıvı nitrojen içinde dondurulan sıçanların beyinlerinde Na^+K^+ -ATPaz değerleri biyokimyasal olarak ölçüldü.

GRUBU	ORTALAMA DEĞER	STANDART HATA
Kontrol (n:6)	0,043	± 0,0044
İskemi (n:9)	0,025	± 0,002
U-74389G (n:9)	0,04	± 0,003
Çözücü (n:9)	0,028	± 0,0033

Tablo 3 : Beyin dokusu Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi ortalama değerleri (unit/mg protein)



Grafik 3 : Beyin dokusu Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi ortalama değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi (unit/mg)

İskemi ve reperfüzyon, Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinde % 42.11

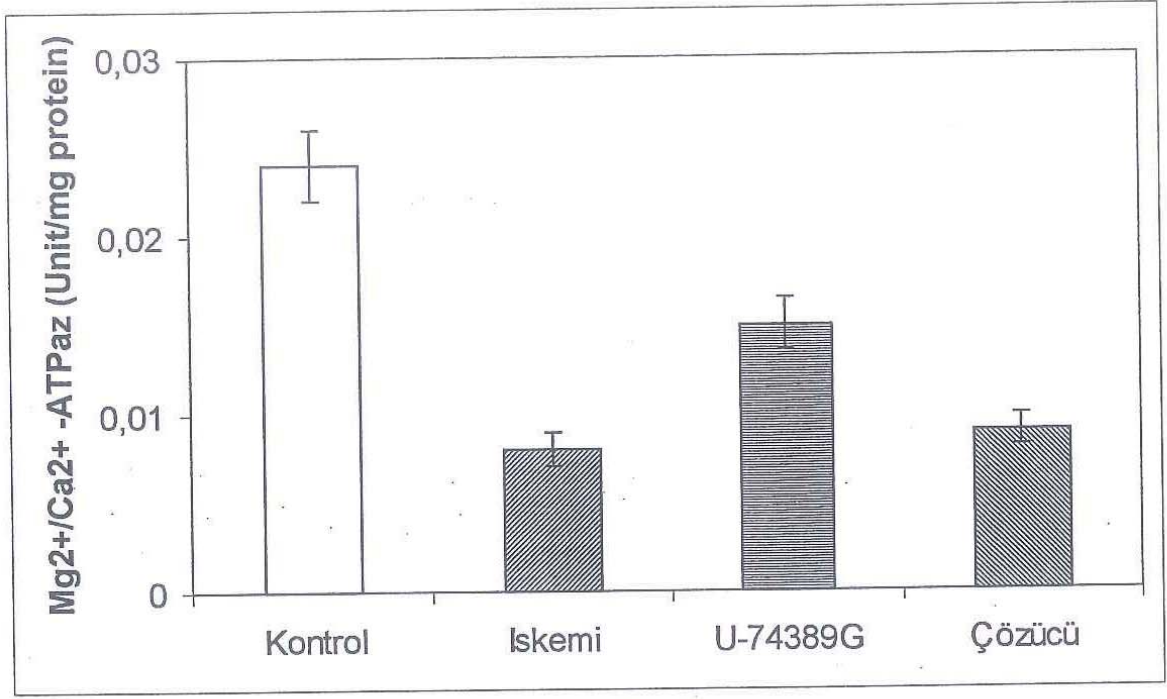
azalmaya neden oldu ($p < 0,001$). Kontrol grubuyla iskemi grubu arasında ve iskemi grubuyla ilaç grubu arasında anlamlı fark görüldü. ($p < 0,01$) Kontrol grubuyla ilaç grubu ve çözücü grubuyla iskemi grupları arasında anlamlı fark görülmedi. ($p > 0,05$)

6.5. SİNAPTOZOMAL $Ca^{+2}Mg^{+2}$ -ATPaz AKTİVİTESİ İLE İLGİLİ BULGULAR

Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi çalışılan aynı sıçanların beyin dokularında ölçülen $Ca^{+2}Mg^{+2}$ -ATPaz değerleri aşağıdaki gibi bulunmuştur ;

GRUBU	ORTALAMA DEĞER	STANDART HATA
Kontrol (n:6)	0,024	$\pm 0,002$
İskemi (n:9)	0,008	$\pm 0,0009$
U-74389G (n:9)	0,015	$\pm 0,0015$
Çözücü (n:9)	0,009	$\pm 0,0009$

Tablo 4 : Beyin dokusu $Ca^{+2}Mg^{+2}$ -ATPaz aktivitesi ortalama değerleri (unit/mg)

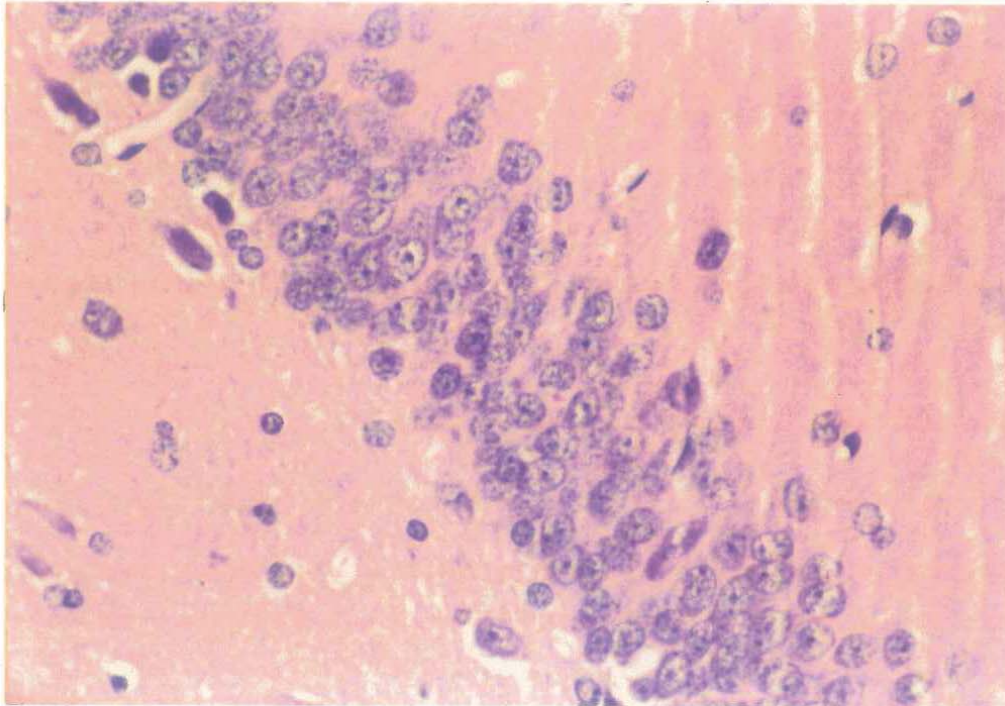


Grafik 4 : Beyin dokusu Ca⁺²Mg⁺²-ATPaz aktivitesi ortalama değerlerinin grafiksel olarak gösterilmesi (unit/mg)

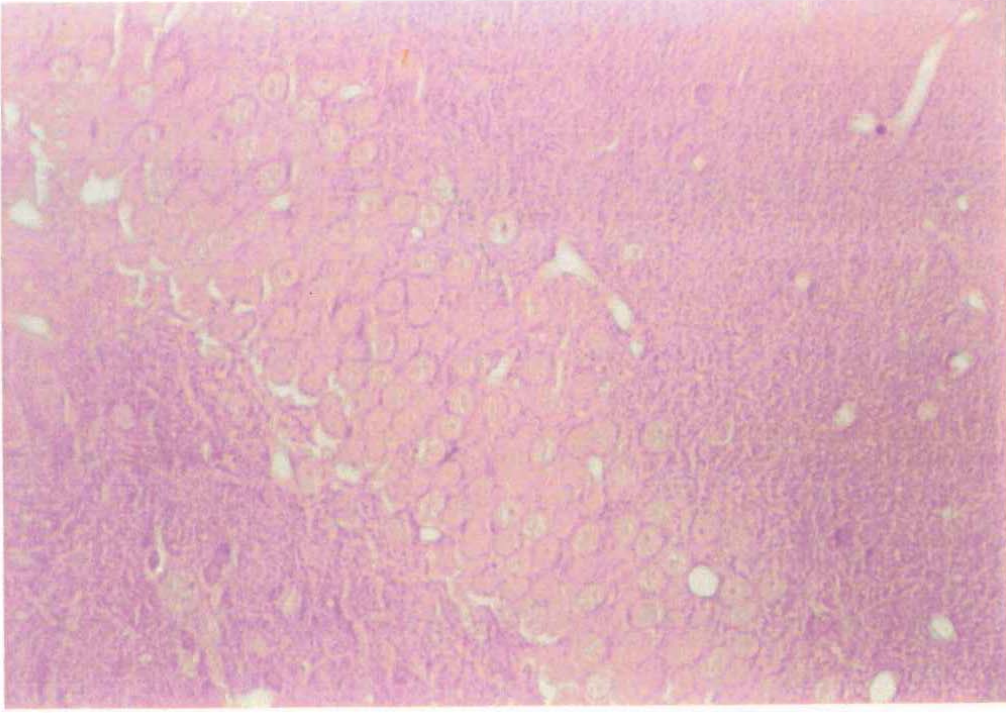
İskemi grubunda, enzim aktivitesi kontrol grubuna göre % 65.7 azaldı (p<0,001). U-74389G ilaç grubuyla iskemi ve çözücü grupları arasında anlamlı bir fark bulundu. (p<0,001) Kontrol grubuyla ilaç grubu arasında anlamlı bir fark varken (p<0,01) çözücü grubuyla iskemi grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p>0,05)

6.6. HİSTOPATOLOJİK GÖRÜNTÜLER

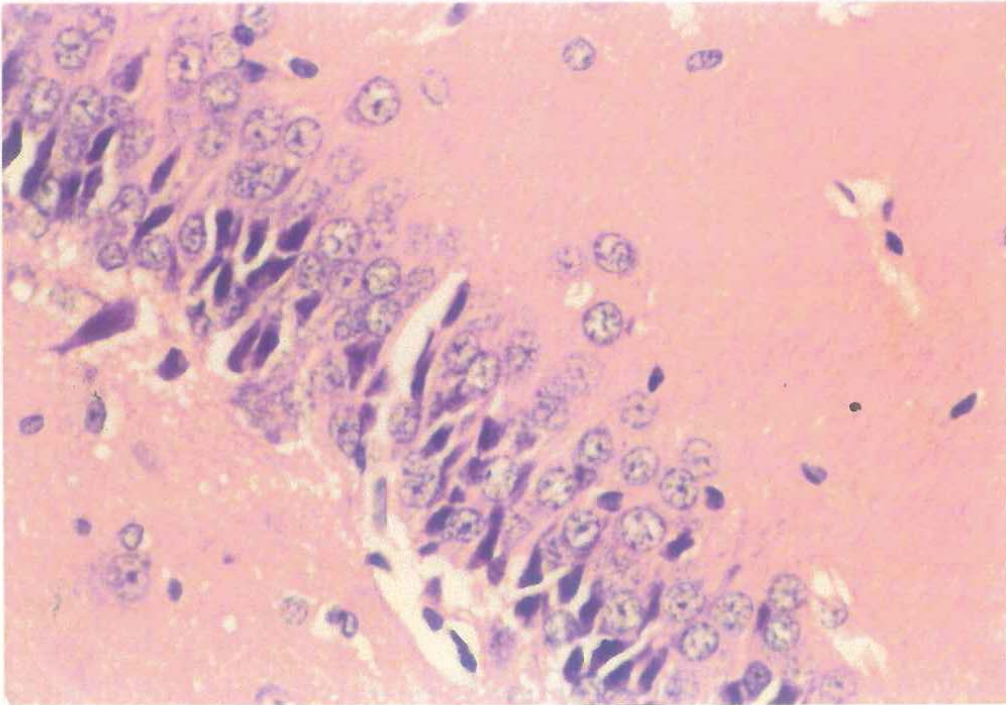
Kendi çalışmamızda, 25 dakikalık global iskemiye takip eden 12 saatlik reperfüzyon sonrasında, iskemi grubuna ait sıçan beyninin hipokampal bölgesinde, hematoxilen eosin boyama ile piknotik nüveli, eozinofilik sitoplazmalı, disintegre, nekrotik nöronlar ve asit fuksin boyama ile koyu kırmızı renkte boyanan nekrotik nöronlar yoğun olarak gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise belirgin derecede nöron hasarı oluşmadı (Şekil 9,10,11,12).



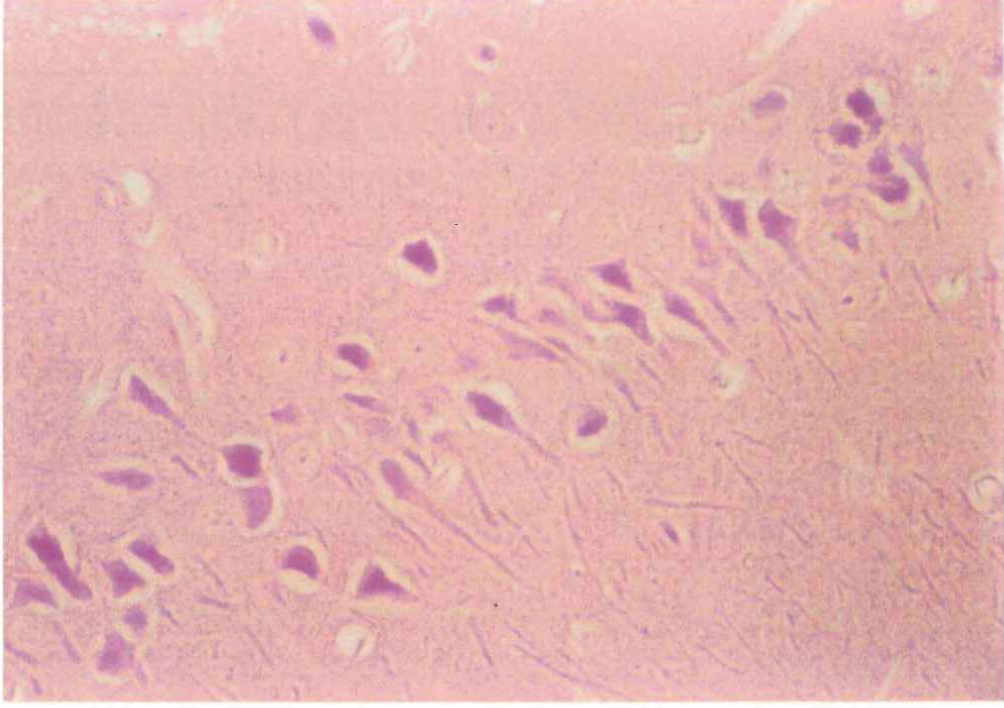
Şekil 9: Kontrol grubuna ait normal görünümlü, nekroz içermeyen nöronlar (Hematoksilen eosin, x200).



Şekil 10: Kontrol grubuna ait nekroz içermeyen, normal görünümlü nöronlar (Asit fuksin, x200)



Şekil 11: İskemi grubuna ait, piknotik nüveli, eozinofilik sitoplazmalı, disintegre nekrotik nöronlar (Hematoksilen eosin, x200).



Şekil 12: İskemi grubuna ait, çok sayıda piknotik nüveli, koyu kırmızı renkli nekrotik nöronların görünümü (Asit fuksin, x200).

7.TARTIŞMA

Oksijen, tüm yaşayan hücreler için temel elementtir; ancak iskemik dokunun re-oksijenizasyonu veya ortamdaki oksijenin fazlalığı, aerobik canlılarda toksik etkilere yol açmaktadır. Bu toksik etki, oksijenin kendisinden değil, oksijen menşeli serbest radikallerden kaynaklanmaktadır (91).

Sıçan beyinde, post-iskemik reperfüzyona bağlı serebral ödem oluşturmak, yoğun kollateral dolaşım nedeniyle oldukça zordur. Literatüre göre, dört damar oklüzyon modeliyle bu konuda % 90 başarı elde etmek mümkündür. Bu çalışmada ortaya çıkan istatistiksel olarak anlamlı düzeydeki KBB hasarı ve ödem oluşumu seçilen deneysel metodun doğruluğunu ve etkinliğini göstermektedir (7).

Travmatize, iskemik ve özellikle reperfüze beyinde, hücre hasarına yönelten mekanizmalardan biri, plazma membranındaki poli doymamış yağ asitlerine saldıran reaktif oksijen cinslerinin lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan formasyonudur (43,92).

Membran fosfolipidleri, birçok enzimin optimum aktivitesi için gereklidir. Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz hücre içi Na^+ , Mg^{+2} ve

Ca^{+2} konsantrasyonlarını ayarlayan membrana bağlı enzimlerdir. Siner uçlarında, özellikle $Ca^{+2}\backslash Mg^{+2}$ -ATPazın yüksek affinitesi vardır ve sinaptozomal membranın lipid muhtevası, özellikle, $Na^{+}\backslash K^{+}$ -ATPaz aktivitesi için gereklidir. Lipid peroksidasyonu, hücre membranı fosfolipidlerindeki poli-doymamış yağ asitlerinin (PUFA) lipid peroksitleri oluşturmak üzere reaksiyona girdiği kompleks bir olaydır ve serbest radikallerin oluşumuyla başlar (45,93).

Beyin, yüksek miktarda PUFA içermesi, düşük anti-oksidan kapasitesi, yüksek miktardaki oksijen tüketimi nedeniyle lipid peroksidasyonuna özellikle duyarlıdır (44,94,95).

Palmer ve arkadaşları (31) bilateral serebral iskemi-reperfüzyon sonrası, gerbil ön beyinde hayli belirgin (% 38.4) $Na^{+}\backslash K^{+}$ -ATPaz aktivite kaybı buldular. 60 dakikalık iskemiye takip eden reperfüzyon sonunda özellikle serebrum, hipokampus, striatum ve talamusta belirgin $Na^{+}\backslash K^{+}$ -ATPaz aktivite kaybı ve özellikle striatumda $Ca^{+2}\backslash Mg^{+2}$ -ATPaz aktivite kaybı (% 37.5) tespit ettiler. Aynı çalışmada, hücre şişmesinin $Na^{+}\backslash K^{+}$ -ATPaz inaktivasyonundan hemen sonra gerçekleştiği görüldü (31).

İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri membran fosfolipidlerine saldırarak $Na^{+}\backslash K^{+}$ -ATPaz ve $Ca^{+2}\backslash Mg^{+2}$ -ATPaz gibi membrana bağlı enzimleri inaktive ederler. Avery

ve Crockard (36), bilateral serebral iskemi ve reperfüzyon sonrası gerbil ön beyinde, özellikle ödeme hassas olan yapılarda adı geçen enzimlerin aktivitelerinde azalma tespit ettiler. Mahadik ve arkadaşları (98), fokal iskemiye tabi tutulan gerbil beyinde, özellikle iskemiye maruz kalan parietal korteksteki total membran fraksiyonunda, erken dönemde Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinde azalma (% 74) gördüler. Ildan (99) ve Jamme'nin (100) çalışmaları, sıçanlarda fokal serebral iskemi modelini takiben Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin kısa sürede azaldığını gösterdi. Diğer taraftan, global iskemiye tabi tutulan sıçan beyindeki $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz aktivite azalması 60. dakikada maksimum olarak Parson'un (101) çalışmasında ortaya çıkmıştır. Vazojenik ödem gelişmesi sırasında, doku su içeriğindeki artışa paralel olarak, Na^+ ve K^+ 'a olan enzim affinitesi ilerleyici olarak azalmaktadır. Na^+K^+ -ATPaz'daki bu değişikliğin nedeni anlaşılmaya çalışılıyor ve membran fosfolipidlerinin organizasyon bozukluğu sorumlu tutuluyor. Dahası, Na^+K^+ -ATPazın ve bunun katalize ettiği iyon hareketlerinin, kısmen indirgenmiş çeşitli oksijen metabolitleri tarafından inhibe edildiğini gösteren deliller de mevcuttur. Ayrıca, Huang W-H ve arkadaşlarının, 1992'de yaptıkları bir çalışmada, serbest oksijen radikallerinin Na^+K^+ -ATPaz aktivitesini enzim alt ünitlerinin fragmantasyonu veya agregasyonu yoluyla inhibe ettikleri ortaya çıkmıştır (31,36,38,79,96,97,98,102,103).

Serbest oksijen radikallerine tabi tutulan erişkin sıçan myositlerinde kısmi Na^+K^+ -ATPaz inhibisyonunun olması, bu hücrelerde serbest radikal kaynaklı hasarda enzim inhibisyonunun öncül bir rol oynadığını göstermiştir. İskemi-reperfüzyon hasarında, hidrojen peroksit, yapısal değişiklik olmaksızın, zamana bağlı geri dönüşümlü enzim inhibisyonu yapmaktadır ve oubaine duyarlı aksolemma enzimi, renal kaynaklı enzime göre hidrojen peroksit'e daha duyarlı bulunmuştur. Böylece, enzim subünitlerinin serbest oksijen radikallerine olan duyarlılığı reperfüzyon hasarındaki aktivite azalmasını açıklamaktadır (79,80,81,82,83,84,85).

Bu çalışmada, Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz aktivitelerinde reperfüzyon sonrası 12. saatte iskemi grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.001$ olacak şekilde anlamlı azalmalar (sırasıyla % 42.11 ve % 65.7) bulundu. Benzer şekilde, post-iskemik reperfüzyon hasarında, Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz enzim aktivitesinde azalma; iskemiye takiben erken dönemde bildirilmiştir. Böylece, serebral ödem oluşumunda, enzim aktivite azalmasına bağlı hücrel iyonik denge bozukluğunun önemi bir kez daha önümüze çıkmaktadır. Serbest oksijen radikali üretimine reperfüzyon tarafından erken dönemde öncülük edilmekte ve serbest radikal üretimi, iskemik sürecin uzunluğuna bağlı olarak patlayıcı tipte olmaktadır. İlaveten, serbest

oksijen radikallerinin, iskemi-reperfüzyon hasarına bağılı erken enzim aktivitesinin azalmasından sorumlu olduğuna dair pek çok delil bulunmaktadır (79,80,81,82,83,104).

Bu alışmada, U-74389G pre-medikasyonunun iskemi-reperfüzyon hasarına bağılı enzim aktivitesinin azalmasında anlamlı derecede koruyucu etki sergilemesi, reperfüzyon sonrası erken dönemdeki serbest radikal üretimi artışının enzimlerin kısmi aktivite bozukluğunda en önemli basamaklardan biri olduğu görüşünü desteklemektedir (81,84).

Post-iskemik reperfüzyon hasarında, hücre içi kalsiyum artışının en önemli basamaklardan birisi olduğu bilinmektedir. Bu alışmada, $Ca^{+2}Mg^{+2}$ -ATPaz aktivitesinin iskemi grubunda belirgin olarak azaldığı ($p<0,001$) gözlenirken U-74389G ilaç grubuna ait enzim aktivitesinin iskemi grubuna göre anlamlı derecede korunduğu ($p<0,001$); ancak ilacın enzim aktivitesini kontrol grubuna yakın değerlerde tutamadığı görülmüştür ($p<0,01$). Bu sonuç, ilacın, $Ca^{+2}Mg^{+2}$ -ATPaz enzim aktivitesi üzerine kısmi olarak koruyuculuğu olduğunu sergilemektedir. Bunun nedeni, ilacın serebral parenkime penetrasyonunun sınırlı düzeyde olması ya da hücre içi kalsiyum artışına yol açan birçok mekanizmanın olaya iştirak etmesi olabilir (10,121,122,75).

Vazojenik beyin ödemi oluşumunda en önemli basamak, kan-beyin bariyeri (KBB) bütünlüğünün bozulmasıdır. Beyin ödemi, ve KBB hasarına yol açan mediatör bileşiklerin primer beyin hasarı bölgesinde oluştuğu veya salındığı, intravasküler boşluktan yıkılan KBB üzerinden parankime geçtiği düşünülmektedir (3,105).

Şu anda, serbest radikallerin tek majör hedefi olarak mikrovasküler yapı öne çıkmaktadır ve serbest radikallerle diğer inflamatuvar reaksiyon mediatörlerinin mikrovasküler fonksiyon bozukluğuna neden olarak ve KBB'de hasar yaparak iskemik lezyonu daha da artırdıkları gösterilmiştir (98,99).

Hidroksil radikali ve peroksinitratın kapiller endotel hasarı yaparak KBB geçirgenliğini artıran serbest radikal türleri olduğu bildirilmiştir. Bu, serbest oksijen radikallerinin vasküler endotel hasarından sorumlu tutulmasını ve endotelyal hücrelerin SOR kaynağı olarak gösterilmesini açıklamaktadır (58,60,106,107,108).

Hipoksik ve anoksik sıçanların beyinlerinin tüm homojenatları, sinaptozomal ve mitokondrial fraksiyonlardaki lipid peroksidasyonu seviyesinde artış olduğunu gösterir. Bu nedenle, kapiller vasküler endotel, lipid içeriğinin yüksekliği nedeniyle serbest radikal hasarına daha duyarlı olabilir (109,110).

Öte yandan, serebral parankimin de patolojik koşullarda SOR ürettiği söylenmektedir (111).

Hayvan deneylerinde, anti-oksidanların serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (45).

21-aminostreoidler, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu engelleyen, hücre membranında toplanmaya meyilli, lipofilik ve vasküler endotele yüksek derecede affinite gösteren ajanlardır (112).

Durmaz ve ark. (50), post-iskemik reperfüzyon hasarında, SOR'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonil dialdehid (MDA) düzeylerini yüksek bulmuşlar ve serebral parankime penetre olabilen bir lazaroid olan U-83836E pre-medikasyonu ile lipid peroksidasyonu önleyebilmişlerdir (50).

Braugler ve Pregoner (115), lazaroidlerin hem korteks hem de hipokampal bölgede nöronal dokuda koruma sağladığını gösterdiler. Başka bir çalışmada, Zhang ve ark. (116), U-74389G'nin, iskeminin neden olduğu hipokampal OH⁻ radikal üretimini önlediğini buldular. U-74389G, post-iskemik sıçanlarda hipokampal yapısal bütünlüğü korumuştur. Ayrıca, parakuadla indüklenen sıçan hipokampusundaki apoptotik hücre ölümünü önleyebilmiştir (115,116,117,118).

Günümüzde, SOR ve lipid peroksidasyonunun serebral iskemi reperfüzyon hasarına yol açtığına dair önemli derecede bilgi vardır (38,114).

Bu çalışmada kullanılan piridin tabanlı, özellikle mikrovasküler sisteme etki eden lazaroid U-74389G'nin pre-medikasyonu, post-iskemik reperfüzyon hasarına bağlı KBB geçirgenliğinin artışı ve serebral ödem oluşumunu kontrol grubuna yakın değerlerde tutabilmiştir ($p>0.05$).

Bu sonuç, vazojenik beyin ödemi oluşumunda, KBB hasarının önemini ön plana çıkarırken KBB hasarı oluşumunda da serbest oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunun önemini ortaya koymaktadır. Yukarıdaki bulgular, KBB hasarı, Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz fonksiyon değişikliklerinin vazojenik beyin ödeminin oluşumunda ana sebepleri teşkil ettiklerine dair olan yaygın görüşü desteklemektedir. Bununla birlikte, iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı serebral ödemde sitotoksik ve vazojenik karakterlerin birarada bulunması beyin su içeriğindeki artışın ortak nedenleridir (119,120).

8.SONUÇ

Travma, iskemi, subaraknoid kanama gibi birçok klinik durumda beyinde serbest radikal bağlantılı lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Bu olgu, hücresel iyon dengesini sağlayan enerji bağımlı membran pompalarının fonksiyon bozukluğu ile birlikte KBB bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta vazojenik beyin ödemiye neden olmaktadır.

Vazojenik beyin ödemi, sadece intrakranial basıncı artırmakla değil sekonder hücre hasarı yaratarak ve infarkt hacmini genişleterek hastanın klinik durumunu kötü yönde etkilemektedir.

Bu araştırmada, dört-damar oklüzyon modeliyle global serebral iskemi oluşturuldu. İki ayrı protokol halinde yürütülen çalışmada, ilk protokoldeki hayvanlarda iskemi grubunda kontrol grubuna göre beyin su içeriği % 3.6 yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Yine , iskemi grubunda, kontrol grbuna göre KBB hasarını gösteren Evans mavisi ekstravazasyon değeri 2,3 kat yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). U-74389G pre-medikasyonu uygulanan grupta ödem oluşumu ve KBB geçirgenliği kontrol grubuna yakın değerlerde olacak şekilde önlenmiştir (

p>0.05).

İkinci protokoldeki hayvanlarda, Na^+K^+ -ATPaz enzim aktivitesi, iskemi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma göstermiştir (p<0.01). $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz enzim aktivitesi iskemi grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede azalma göstermiştir (p<0.001). U-74389G pre-medikasyonu uygulanan grupta Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi kontrol grubuna yakın değerlerde (p>0.05) korunurken, $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz aktivitesi iskemi grubuna göre belirgin şekilde korunmuştur (p<0.001).

Bu sonuçlar göstermektedir ki; post-iskemik reperfüzyon hasarında erken dönemde enerji kaybı ve muhtemelen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan hücre membranı harabiyetine bağlı olarak Na^+K^+ -ATPaz ve $\text{Ca}^{+2}\text{Mg}^{+2}$ -ATPaz gibi enzimlerin aktiviteleri azalmaktadır. Bu olgu, sonuç olarak hücrel iyonik dengeyi bozarak öncelikle sitotoksik karakterli beyin ödemeine neden olmaktadır. Ayrıca, serbest radikal aracılı mikrovasküler endotel hasarı ile K.B.B geçirgenliği artmakta ve vazojenik karakterli beyin ödemi gelişmektedir.

Lazaroid (21-aminosteroid), özellikle mikrovasküler sisteme etki eden U-74389G'nin pre-medikasyonu ile hem enzimatik aktivasyon hem de KBB bütünlüğü korunarak beyin ödemi oluşumu anlamlı derecede önlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında, lazaroid grubu ilaçların, klinik çalışmalar

sonrası, iskemik stroke geçiren hastalarda, sekonder beyin hasarının ve beyin ödeminin önlenmesinde yararlı olacağı kanısındayız.

9. KAYNAKLAR

1. Gary A R: Ischemic brain edema. Progress in Cardio Vascular Diseases. Vol 42, No:3(Nov-Dec) 1999; 209.
2. Bell BA: A history the study of cerebral edema. Neurosurgery 1983, 13:724-8.
3. Klatzo I: Presidential Adress: Neuropathological aspect of Brain edema. J Neuropathol Exp Neurol 1981, 26:1-13.
4. Gimsberg MD, Pulsinelli WA: The ischemic penumbra injury thres holds and the therapeutic window for acute stroke. Ann Neurol 36:553, 1994.
5. Sresjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part II. Mechanisms of damage and treatment. J Neurosurg 1992, 77:337-54.
6. Sresjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I. Pathophysiology J Neurosurgery 1992, 72:169-84.
7. Tatsuo Mima: Forebrain Ischemia in the rat;The Four-Vessel Occlusion Model. Central Nervous System Trauma: Research Techniques 107-117.
8. Pulsinelli W.,Buchman A., 1988.The 4-Vessel occlusion rat model; method for complete occlusion of the vertebral arteries and control of the collateral circulation. Stroke 19: 913-914
9. Durmaz R: Serbest radikaller ve vazojenik beyin ödemi. Osmangazi Ü Tıp Fak.Dergisi, 1999, cilt XX, sayı I:89-113.
10. Özdemir G: İskemik strokta tedavi ilkeleri. Beyin Damar Hastalıkları Der, Yayın No:2:1-17, 1995.
- 11.Leslie N M: Margaret R, Weglinski: Pathophysiology of metabolic brain injury. Anesthesia and Neurosurgery 1994, 59-92.
12. Collins RC, Debkin BH, Choi DW: Selective vulnerability of the brain: New insights in to the pathophysiology of stroke. Ann Intern Med 110:992, 1989.
13. Hennerici M, Hacké N, Gelmers HJ and Kramer G: Cerebral ischemia. Springer-Verlag, Berlin 1991 (1-16).
14. Pulsinelli WA and Lewy DE: Textbook of internal medicine. Section Seven/Cerebrovascular diseases. Saunders 19th Ed. 1992, 2145-52.

15. Janzer RC: The blood brain barrier. Cellular basis. *J Inker Metab Dis* (1993) 16:639-47.
16. Oldendorf WH: Blood brain varrier. In Himwich HE (Ed): *Brain metabolism and cerebral disorders* (Ed.2). New York 1976. Spectrum Publications.
17. Klatzo I, Bhui F, Fujiwara K: Aspects of the blood brain barrier in brain edema. In the Vliieger M, de longé SA, Beks JNF (Eds): *Brain edema*. Nuewyork 1981, Wiley.
18. Graig NH (1989): Brain tumors and the blood brain barrier In Neuwelt EA (Ed). *Implications of the blood brain barrier and its manuplation*. Plenum Newyork , London, 2:77-106.
19. Abbott NJ: Revest PA, Romere IA: Astrocyte-endothelial interaction: Physiology and pathology. *Neuropathol App Neurobiol*, 1992, 18:424-33.
20. Baethmann A, Maier-Hauff K, Schürer L, Lange M, Guggenbichler C, Vagt W, Jacob K, Kempolki O: Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 1989, 70:578-91.
21. Nagy Z, Szabe M, Huttner I (1985): Blood brain-barrier impairment, by low pH buffer perfusion viathe internal carotid arley in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 68:160-3.
22. Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I (1985): The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol (Berl)*, 68:122-9.
23. R.Hicks, H.Soaes et al.:Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat.*Acta Neuropatho*. 1996:Vol 91;236-246
24. Ikeda Y, Wang M and Nakazawa S: Simple quantitative evaluation of blood brain barrier disruption in vazogenic brain edema. *Acta Neurochir* 1994 (Suppl), 60:119-20.
25. Adams JH (1992) Head injury.In: Adams JH, Duchen LW (eds) *Greenfeld's neuropathology*, 5th edn.Oxford University, New York, pp 106-152
26. Mayhan WG, Didion SP: Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke*, 27:965-70, 1996.
27. Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, et al: Brain injury, edema and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*, 34:315-20, 1984.
28. Mun-Bryce S, Rosenberg GA: Matrix metalloprotein-ases in cerebrovascular disease (Review) *J Cereb Blood Flow Metab*, 18:1163-72, 1998.

29. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, et al: TIMP-2 reduced proteolytic opening of blood-brain by type IV Collagenase. *Brain Res*, 576:203-7, 1992.
30. Belayev L, Busto R, Zhao W, et al: Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 739:88-96, 1996.
31. Palmer GC, Palmer S JO, Barbara C, Christiepope AS, Callahan III MD, Taylor and Zynne J. Eddy: Classification of ischemic-induced damage to Na⁺ - K⁺ ATPase in Gerbil fore brain. *Neuropharmacology*. 24(6):509-16, 1985.
32. Enselit WT, Doner FR, Jarrott DM and Baricos WH (1984): Verebral phosphalipid content and Na-K-ATPase activity during ischemia and postischemic reperfusion in the mongolian Gerbil. *J Neurochem* 43:320.
33. T. Shigeno T, Asano T, Mima K, Takakura: Effect of enhanced capillary activity on the blood brain barrier during focal ischemia in cats. *Stroke* 20 (1989), 1260-6.
34. Kawashima J, Fujistani B, Nakamura K, Kadokawa T, Yoshida K and Shimizu M (1976): Biochemical changes in unilateral brain injury in the rat: *Brain Research* , 110:547-57.
35. Nakazawa S (1969): Biochemical studies of serebral tissues in experimentally induced edema. *Neurology* 19:269-76.
36. Avery S, Crockard HA and Russel RR(1984): Evaluation and resolution of edema following severe temporary cerebral ischemia in the Gerbil. *J Neurol Neurosurg Phyciat* 47:604-10.
37. Mc millian V and Shankaran R (1984): Influence of lactate accumulation on Na-K-ATPase activity of ischemic and postischemic brain. *Brain Research* 303:125-32.
38. Riquolet M, Aveset N, Chadon F (1983): Energy producing machinery in vazogenic brain edema. *Neurochem Pathol*, 1:43-7.
39. Tissari AH, Schonoler PS and Bagdauski BB: *Molec. Pharmacology* 5:593, 1969.
40. Demopoulos HB, Flaman E, Seligman M: Oxygen free radicals in central nervous system ischemia and trauma. In Auter AP (Ed.) *Pathology of Oxygen*. Newyork, Academic Press, 1982 (127-55).
41. Ikeda Y, Long DM: The molecular basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*, 27:1-11, 1990.
42. Mc Cord JM: Human disease, free radicals and oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*, 1993, 26:351-7.
43. Cheeseman KH and Slater TF: An introduction of free radical biochemistry. *Br Med Bulletin*, 1993, 49:481-93.

44. Laurent B, Ardaillou R: Reactive oxygen species: Production and role in kidney. *Am J Physiol*, 1986, F:765-76.
45. Holley AR, Cheeseman KH: Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bulletin*, 1993, 49/3:494-505.
46. Yagi K: Lipid peroxidase and related radicals in clinical medicine. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, 1994, 1-14.
47. Fischer M, Levine PH, Cohen RA. A 231-aminosteroid reduced hydrogen peroxide generation by and chemiluminescence of stimulated human leucocytes. *Stroke*. 1990;21(10):14 35-8
48. K.kogure, H.Arai, K. Abe. Free radical damage of the brain following ischemia. *Brain Res*. Vol 63. ; 237-258.
49. Carafoli E. (1987); Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56,395-433.
50. Durmaz R, İnal M, Angin M, Atasoy MA, Tel E: The effects of MK-801 and U83836E on postischemic reperfusion injury in rat brain. *Acta Neurobiol Exp*, 1999, 59:99-104.
51. Gidday JM, Beetsch JW, Park TS: Endogenous glutathione protects cerebral endothelial cells from traumatic injury. *J Neurotrauma* 1999, 16:27-36.
52. Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA: Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 1993, 60:588-94.
53. Whalen MJ, Carlos TM, Kochanek PM, Heineman S: Blood brain barrier permeability neutrophil accumulation and vascular adhesion molecule expression after controlled cortical impact in rats: A preliminary study. *Acta Neurochir Suppl*, 1998, 71:212-4.
54. Kinuta Y, Kimura M, Hokawa Y: Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. *J Neurosurgery* 1989, 71:417-20.
55. Welin MS: Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 1996, 3:1-17.
56. Balentine, J.D. 1977; Experimental pathology of oxygen toxicity. In: F.F. Jobsis (Ed.), *Oxygen and physiological function*. Professional Information Library, Dallas, TX. Pp311-378.
57. Beetsch JS, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM: Xsantine oxidase driven superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 1988, 786:89-95.
58. Imaizumi S, Konda T, Deli MA, Gobbel G, Joo F, Ebstein CJ, Yoshimato T, Chan PH: The influence of oxygen free radical on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. 1196, 29:205-11.
59. Kumar M, Liu GJ, Floyd RA, Grammas P: Anoxic injury of endothelial cells increases production of nitric oxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219:497-501.

60. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML: Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostoglandin synthesis in cats. *Circ Res* 1985, 57:142-51.
61. Chan PH, Longar S, Fishman RA: Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema. *Ann Neurol* 1987, 21:540-7.
62. Ikeda Y, Ikeda K, Long DM: Protective effect of the iron chelator desferoxamine on cold-induced brain edema. *J. Neurosurg* 1989, 71:233-8.
63. Feelisch M, Poel MT, Zamara R, Deussen A, Moncada S: Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 1994, 368:62-5.
64. Huie RE, Pedmaja S: The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radic Res Commun*, 1993, 18:195-9.
65. Gidday JM, Park TS, Shah AR, Gonzales ER: Modulation of basal and postischemic leukocyte-endothelial adherence by nitric oxide. *Stroke*, 1998, 29:1423-30.
66. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA: Apperent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injruy from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:1620-4.
67. Thomas PD, Mac GD, Robinovitch A, Poznaski MJ. Inhibition of superoxyde generating NADPH oxidase of neutrophils by Lazaroids. *Biochem. Pharmacol.* 1993:45,241.
68. Churn S.B. (1995); Multifunctional calcium and calmodulin-dependent kinase II in neuronal function and diseases. *Adv. Neuroimmuno.* 5, 241-59
69. Miller R.J. (1991). The control of neuronal calcium ion homeostasis. *Prog. Neurobiol.* 37, 255-85.
70. Zhang L., Andou Y., Masuda S. et al (1993); Dandrolen protects against ischemic, delayedneuronal death in gerbil brain. *Neuroscience Letters*, 158, 105-108
71. Frandzen A. and Schousboe A. (1991); Dandrolen prevents glutamate cytotoxicity and calcium ion release from intracelluler storees in cultured cerebral cortical neurons. *J. Neurochem*, 56, 1075-8
72. Kaprielian Z., Campbell A. et al., (1989); Identification of a Ca-ATPase in cerebellar purkinje cells. *Mol. Brain Research*, 6, 55-60.
73. Chan PH, Fischman RA. Brain edema: Induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids. *Science*, 1978,201:358-360

74. Limbrick D.D., Churn S.B., Sombati S. et al (1995); Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death. *Brain Research*, 690, 145-156
75. J.T. Parsons et al. Ischemia-induced inhibition Ca^{+2} uptake. *J. Neurochem.* Vol. 68 No:3, 1997
76. Chan PH, Schmidly JW et al. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*, 1984. Vol. 34:315-20
77. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML. Free radicals in cerebral ischemia, *Stroke*, 1978.; 9:445-7
78. Greenwood J: Mechanisms of blood barrier breakdown. Review article; *Neurorad.* 1991. 33:95-100
79. Xie Z, Wang Y, Askari A, Huang WH, Klaunig JE and Askari A: (1990) *J Mol Cell Cardiol*, 22:911-20.
80. Huang WH, Wang Y and Askari A (1992): *Int J Biochem*, 24:621-6.
81. Wuhsung H, Yanong W, Askari A, Nina Z, Mehdi G: Different sensitivities of the $Na^{+} K^{+}$ ATPase isoforms to oxidants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1190 (1994):108-24.
82. Sweadner KJ (1989): *Biochimica et Biophysica Acta*, 988:185-220.
83. Penyasomy SM, Lane LK and Askari A (1979): *Biochem Biophys Res Commun*, 86:742-7.
84. Stadtman ER and Oliver CN (1991): *J Biol Chem*, 266:2005-8.
85. Flaherty JT and Weisfeldt ML (1988): *Free Radical Biol Med*, 5:409-19.
86. Demediuk P, Lemke M, Faden T: Spinal cord edema and changes in tissue content of Na, K and Mg after impact trauma in rats. In *Advances in Neurology* (Long D, et al Ed). Raven Press, 1990, 52:225-32.
87. Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shahami E: Blood brain barrier permeability, cerebral edema and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesth Analg*, 77:141-8, 1993.
88. Braugler JM, Hall ED: Acute enhancement of synaptosomal (Na, K) ATPase activity in cats following intravenous methylprednisolone. *Brain Research*, 219:464-9, 1981.
89. Matteucci E, Cocci F, Pellegrini L, Gregori G, Giam PO: Measurement of ATPases in red cells: Setting up and validation of a highly reproducible method. *Enzyme Protein*, 48:105-19, 1994-5.
90. Motulsky HJ: *Graph Pad*. San Diego: Graph Pad, Software Inc, 1994,5.
91. Halliwell B, Gutteridge JMC: Oxygen toxicity, oxygen radical transition metals and disease. *Biochem J* 1984, 219:1-14.

92. Braughler JM, Hall ED, Jacobsen EJ, Mac Call JM, Means ED (1989): The 21 aminosteroids: Potent inhibitors of lipid peroxidation for treatment of central nervous system trauma and ischemia. *Drug Future*, 14:143-52.
93. Lin SC, Way EL: A high affinity Ca ATPase in enriched nerve ending plasma membranes. *Brain Res*, 235:387-92, 1982.
94. Hall ED, Braughler JM: Free radicals in CNS injury molecular and cellular approaches in the treatment of neurological disease, 1993, 81-105.
95. Kontos A: Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 1985, 57:508-16.
96. Sresjo BK, Agarth CD and Benqtsson F: Cerebrovascu. *Brain Metab Rev*, 1989, 1:165.
97. Shaheen AA, Abd El Fattah AA and Gad MZ: Effect of various stressors on the level of lipid peroxide antioxidants and Na-K ATPase activity in rat brain. *Experientia* 1996, 52:336-9.
98. Mahadik SP, Bharucha VA, Stadlin A, Ortiz A, Karpiak SE: Loss and recovery of activities of alpha+ and alpha isozymes of Na-K ATPase in cortical focal ischemia: GM 1 Ganglioside protects plasma membrane structure and function. *J Neurosci Res*, 32:209-20, 1992.
99. Ildan F, Polat S, Göçer AI, Öner A, İşbir T, Mete UD, Kaya M, Karadayı A: The effects of the pretreatment of intravenous high dose methylprednisolone on Na (+)- K(+)/Mg (+2) ATPase and lipid peroxidation and early ultrastructural findings following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuroschir (Wien)*, 138:338-45, 1996.
100. Jamme I, Petit E, Gerbi A, Maixent JM, Mac Kenzie ET, Nouvelot A: Changes in ouabain affinity of Na⁺, K⁺, -ATPase during focal cerebral ischaemia in the mouse. *Brain Res*, 774:123-30, 1997.
101. Parsons JT, Churn SB, De Lorenzo RJ: Ischemia-induces inhibition of calcium uptake in to rat brain microsomes mediated by Mg⁺²/Ca⁺² ATPase. *J Neurochem*, 68:1124-34, 1997.
102. Kaminishi T, Matsuoka T, Yanagishita T and Kako KJ (1989), *Am J Physiol* 256 C.598-607.
103. Kukreja RC, Weaver AB and Hess ML (1990). *Am J Physiol*, 259 H:1330-6.
104. Dimagl U, Lindauer U, Them A, Schreiber S, Pfister HW, Koedel U, Reszka R, Freye RD, Villringer A (1995): Global cerebral ischemia in the rat: On line monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15:929-40.

105. Baethman L, Hauff KM, Kempinski O, Unterberg A, Wahl M, Schurer L: Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Medicine*, 1988:972-8.
106. Oldendorf WH, Cornform ME, Brown WJ: The large apparent work capability of the blood brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in the brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1977, 1:409-17.
107. Tayarani I, Chaudiere S, Lefauconnier JM, Bourre JM: Enzymatic protection against peroxidative damage in isolated brain capillaries. *J Neurochem* (1987), 48:1399-402.
108. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC: Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* (1991), 71:1185-95.
109. Minyailenko TD, Pozhorov VP and Sererelenko MM *Chem.Phy.Lipids* (1990) 55:25.
110. Dzhafarov AL, Magomedov NM, Babaev KF, Akhemedova GS, and Bekhbudova ZA. *Vop.Med.Khim.* 1989(35/51).
111. MD Ginsberg, Neuroprotection in brain ischemia; an update Part II *Neuroscientist* 1(1995), 164-175
112. Hall ED, McCall JM, Means ED; Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma and ischemia and subarachnoid hemorrhage. *Adv. Pharmacol.* 28 (1994) 221-268.
113. Del Maestro et al..Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. II.Role of superoksidge anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *Microvasc. Res.* 1982;22:255-70
114. N. Averet, M.Riquolet and F.Chadon. Modifications of synaptosomal Na,K-ATPase activity during vasogenic brain edema in the rabbit. *J. Neurochemistry* 1984, 275-7.
115. Braughler JM and Pregenzer JF; 21-aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation. Reactions with lipid peroxy and phenoxy radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 7:125-30, 1989.
116. Jing Zhang, Claude A, Piantodosi. Prolonged production of hydroxyl radical in rat hippocampus after brain ischemia-reperfusion is decreased by 21-aminosteroids. *Neuroscience Letters* 1994(177): 1227-130.
117. T.Seng MT, Chan SA, Reid K, Iyer V. *Neurological Research*,19(4): 431-34,1997. postischemic treatment with lazaroid U-74389G prevents transient global ischemic damage in rat hippocampus.

118. Melchiorni D, Diel Duca C, Piccirillis et al: Intrahippocampal injection of paraquod produces apoptotic cell death which is prevented by the lazaroid U-74389G in rats. *Life Sciences*, 62:21,1927-1932. April 1998
119. A.L. Bertz, SR Ennis, GP Schielke; Blood brain barrier sodium transport limits development of brain edema during partial ischemia in gerbils. *Stroke* 20 (1989): 1253-59
120. GP Schielke, HC Moises, AL Bertz. Blood to brain sodium transport and interstitial fluid potassium concentration during early focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1991 (11):466-471.
121. Braugher JM, Hall ED, Jacobsen EJ, McCall et al; The 21-aminosteroids; potent inhibitors of lipid peroxidation for the treatment of central nervous system trauma and ischemia. *Drugs Future.* 1989;14(2:),143-52
122. J.J. Hoballah, CR Mohan et al; Effects of the lazaroid U-74389G (21-aminosteroid) on skeletal muscle reperfusion injury in rabbits. *Int. Angiology.* Vol. 15, 61-66 (1996).