



T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**SELEKTİF TRANS-ARTERYAL MİKROKATETERİZASYON
YÖNTEMİ İLE PARÇALANABİLİR NİŞASTA MİKROKÜRECİKLERİ
KULLANILARAK GEÇİCİ SEREBRAL İSKEMİ MODELİ
OLUŞTURULMASI VE İNTRAKAROTİD SODYUM TİYOPENTALİN
GEÇİCİ İSKEMİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Murat GÖKTEN

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2018



T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**SELEKTİF TRANS-ARTERYAL MİKROKATETERİZASYON
YÖNTEMİ İLE PARÇALANABİLİR NİŞASTA MİKROKÜRECİKLERİ
KULLANILARAK GEÇİCİ SEREBRAL İSKEMİ MODELİ
OLUŞTURULMASI VE İNTRAKAROTİD SODYUM TİYOPENTALİN
GEÇİCİ İSKEMİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Murat GÖKTEN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Burçak BİLGİNER

ANKARA

2018

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak bu çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük desteği ve emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Burçak Bilginer' e teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Servet İnci ve Nöroşirürji Anabilim Dalı' nda görevli değerli öğretim üyelerim Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker, Sayın Prof. Dr. Atilla Akbay, Sayın Prof. Dr. Melike Mut Aşkun, Sayın Doç. Dr. Halil Kamil Öge ve Sayın Yrd.Doç. Dr. Ahmet İlkey Işıkyay' a mesleki bilgi ve tecrübelerini, uzmanlık eğitimim süresince benimle paylaştıkları ve eğitimimde gösterdikleri özveri için teşekkür ederim.

Radyolojik çalışmaların gerçekleştirilmesinde gösterdiği katkılarından dolayı Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Anıl Arat, Dr.Osman Öcal'a, histolojik incelemelerin tamamlanmasındaki katkılarından dolayı Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu'na ve Dr.Selim Zırh'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma desteklerini ve dostluklarını esirgemedikleri için ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan değerli anneme, babama ve de uzmanlık eğitimim süresince gösterdiği sabır ve anlayış için değerli eşim Dilara Bulut Gökten'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Gökten, M. Selektif trans-arteryal mikrokaterizasyon yöntemi ile parçalanabilir nişasta mikrokürecikleri kullanılarak geçici serebral iskemi modeli oluşturulması ve intrakarotid sodyum tiyopentalin geçici iskemi üzerine olan etkilerinin araştırılması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.

Selektif trans-arteryal mikrokaterizasyon yöntemi ile vasküler yapılar içerisine parçalanabilir nişasta mikroküreciklerinin kemoterapötik ajanlarla kullanımı uzun senelerdir kullanılmakta olan bir tedavi yöntemidir. Bu uygulamanın klinik hedefi hedef dokuda yüksek dozda ilaç konsantrasyonu sağlanırken, bu yüksek konsantrasyonlara rağmen düşük sistemik yan etki görülmesini sağlamaktır. Ayrıca nişasta molekülleriyle arteryal embolizasyonun sağlanması ve tümör dokusunun beslenmesinin bozulması hedeflenmektedir. Beyin dokusunun iskemiyeye olan hassaslığı yapılan çalışmalarla bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre inme; yirmi dört saatten uzun süren, ölüme ya da nörolojik defisite yol açan, vasküler nedenler dışında bir sebep bulunamayan, beyin fonksiyonlarının fokal veya total kaybı ile karakterize tablodur. İnme ölüm sebepleri içerisinde üçüncü ve sakatlık yönünden de birinci sırada olan hastalık grubudur.

Serebrovasküler hastalıkların % 80-85'ini oluşturan iskemik inme, nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan hastalıktır. Serebral iskeminin klinik pratikteki önemi, değişik biçimlerdeki deneysel iskemi modellerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir. Odaktaki hücreler, genellikle hızla reperfüzyon sağlanılmazsa aynı şekilde kalırlar. Penumbanın içerdiği hücreler ise risk altında oldukları halde en az 4-8 saat yaşayabilir durumda olabilmektedir. Penumbadaki hücreler, reperfüzyon veya ilaçlarla kurtarılabilir ve penumbal alana doğru infarktın genişlemesi engellenebilir.

Sodyum tiyopentalin iskemi sürecine etkisi daha önceki çalışmalarda intravenöz yolla bir çok makalede ortaya konmuştur. Ancak intravenöz verilen tiyopentalin gerek yan etkileri gerekse kontrolünün zor olmasından dolayı kullanımı yaygınlaşamamıştır. Bu çalışmadaki amacımız tiyopentalin intrakarotid olarak intraarteriyel yoldan daha düşük dozlarda da verilerek serebral supresyonu sağlamak ve iskemi süreci üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu yöntemin başarılı olması durumunda akut inme geçiren hastalarda intrakarotid olarak uygulanan trombolitik tedavi yanında tiyopental uygulamasının

yaygınlaştırılarak iskemi süreci sırasında iskemi süresini uzatmak ve mortalite ve morbiditenin azaltılması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Selektif trans-arteryal mikrokaterizasyon, parçalanabilir nişasta mikrokürecikleri, serebral iskemi, tiyopental , EEG,



ABSTRACT

Introduction of a novel transient cerebral ischemia model by using the degradable starch microspheres through selective trans-arterial microcatheterization and investigation of the effects of intracarotid thiopental on this model, Hacettepe University, Medical School, Neurosurgery specialization thesis, Ankara, 2018.

Degradable starch microspheres combined with chemotherapeutic agents applied into vascular structures by selective trans-arterial microcatheterization method to achieve locoregional tumor treatment is frequently performed. The aim of these clinical practices is to impair tumor blood supply, reduce the side effects and systemic toxicity and acquire higher drug concentrations in target organ. There are many studies research brain tolerance to ischemia. Stroke is defined by the World Health Organization⁷ as ‘a clinical syndrome consisting of rapidly developing clinical signs of focal (or global in case of coma) disturbance of cerebral function lasting more than 24 hours or leading to death with no apparent cause other than a vascular origin. Ischemic stroke consists of 80-85% of cerebrovasculer diseases and is most frequent disease that causes death. Because of these results many experimental stroke models have been developed for understanding the stroke’s exact mechanism. Penumbra is shown to be more tolerable for ischemia or easy to survive in ischemic conditions. There were not enough studies about the brain which is considered to be very sensitive because a short period of ischemic condition can cause permanent neurological deficits. In this study; cerebral ischemia was created by the introduction of degradable starch microspheres via selective trans-arterial microcatheterization. Thiopental effects on ischemia are published in many papers in recent years. Thiopental has many side effects and hard to control its effects because it has very narrow clinical usage. In this study we achieved cerebral supression by low dose intraarterial thiopental and by using lower doses avoided the side effects of thiopental. If intracarotid thiopental achieves on cerebral ischemia it can be used with trombolitic agents on acute stroke patients. Thiopental can elong the ischemia time and as a result it can lower the mortality and morbidity.

Keywords: Selective trans-arterial microcatheterization, degradable starch microspheres, cerebral ischemia,

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	3
ÖZET	4
ABSTRACT	6
İÇİNDEKİLER	7
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
2.GENEL BİLGİLER.....	10
2.1 Transkateter embolizasyonun tarihçesi	10
2.2 Parçalanabilir Nişasta mikrokürecikleri (PNM)	11
2.3 Beyin kan dolaşımı ve iskemi patofizyolojisi	14
2.4 Serebral İskemide fizyopatoloji	19
2.5 İskemi patofizyolojisi	22
2.6 Deneysel Serebral İskemi Modelleri	28
2.6. Kemirgenlerdeki Serebral İskemi Modelleri	29
2.7. Tavşan Beyninin Vasküler Anatomisi	31
2.8. Tiyopental farmakokinetiği ve farmakodinamiği	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Deney Grupları	37
3.2. Anestezi	38
3.3. Trans-arteryal Mikrokateterizasyon	38
3.4. Parçalanabilir Nişasta Mikrokürecikleri Uygulanması	40
3.5. Deneklerin Sakrifikasyonu ve dokuların çıkarılması.....	40
3.6. Histopatolojik Değerlendirme	42
3.7 İstatistik Değerlendirme.....	44
4. BULGULAR.....	44
4.1.1 Kontrol Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme	44
4.1.2 Tiyopental Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme	45
4.1.3 İskemi Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme	47
4.1.4 İskemi + tiyopental Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme	48
5. İSTATİSTİK	50

6. TARTIŞMA	57
7. SONUÇ	60
8. KAYNAKLAR.....	61



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parçalanabilir nişasta molekülleri (PNM) temel olarak amilopektin ve amilozdan oluşmaktadır. Hidrofilik yapıda granüllü moleküllerdir. [1]. Alfa-amilaz enzimi tarafından parçalanan bu partiküllerin ortalama boyuları 20-200 mikrometre arasındadır.[2]. PNM'nin plasmadaki ortalama yarı ömrü 35-40 dakika kadardır.[2]. PNM bir çok alanda embolizan ajan olarak kullanılmakla birlikte asıl olarak baş-boyun, akciğer ve özellikle karaciğer tümörlerinin lokorejyonel transarteriyel kemoembolizasyon (TAKE) tedavisinde kemoterapötiklerle birlikte kullanılmaktadır [3]. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre inme; yirmi dört saatten uzun süren, ölüme ya da nörolojik defisite yol açan, vasküler nedenler dışında bir sebep bulunamayan, beyin fonksiyonlarının fokal veya total kaybı ile karakterize tablodur. İnme ölüm sebepleri içerisinde üçüncü ve sakatlık yönünden de birinci sırada olan hastalık grubudur[4]. Serebrovasküler hastalıkların % 80-85'ini oluşturan iskemik inme, nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan hastalıktır. Serebral iskeminin klinik pratikteki önemi, değişik biçimlerdeki deneysel iskemi modellerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir [5]. Odadaki hücreler, genellikle hızla reperfüzyon sağlanılamazsa aynı şekilde kalırlar. Penumbra'nın içerdiği hücreler ise risk altında oldukları halde en az 4-8 saat yaşayabilir durumda olabilmektedir. Penumbra'daki hücreler, reperfüzyon veya ilaçlarla kurtarılabilir ve penumbral alana doğru infarktın genişlemesi engellenebilir[6]. Serebrovasküler olayların tedavisinde kullanılan trombolitik tedavinin asıl amacı penumbra'nın kurtarılmasıdır. Son yıllarda akut iskemik inmenin ilk 6 saat içerisindeki başlıca tedavisi intraarteriyel trombolitik tedavi olarak kabul edilmektedir[7]. Yapılan çalışmalarda intravenöz verilen trombolitik tedaviye göre pıhtı çözülmesi oranlarının daha yüksek ancak kanama riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir[8]. Trombolitik tedavi sırasında angiografi kateteri büyük damarı tıkayan pıhtının hemen yanına kadar ilerletilerek trombolitik ajan verilmektedir. PNM literatürde serebral iskemi modellerinde iki adet çalışmada kullanılmıştır. Bunlardan birincisi 1992 yılında Laccourreye ve arkadaşları tarafından sıçanların eksternal karotid arterlerinden girilerek retrograd olarak internal karotid artere dolayısıyla beyne PNM verilerek iskemi oluşturup oluşturmadığının gözlenmesidir[9]. Bu çalışmada sıçanlar 2 gruba ayrılmış, ilk gruba 600000 partikül ve diğer gruba ise 300000 partikül verilmiştir. Yüksek doz verilen grupta kalıcı nörolojik sekel gözlenirken düşük doz grubunda ise hemiparezi 7 gün içerisinde düzeldiği gözlenmiştir[9]. Literatürdeki ikinci çalışma ise 1981 yılında Winding ve arkadaşları

tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada yine iki grup belirlenmiş 1000000 ve 2000000 partikül verilerek oluşturulan gruplarda düşük doz grubunda herhangi bir etki gözlenmez iken yüksek doz grubunda ise ani ölüm görülmüştür[10]. Barbituratlar yıllar boyunca serebral iskemi modellerinde kullanılmıştır. Barbituratların serebral iskemi üzerindeki beyin koruyucu etkileri bilinmektedir[11]. Bir barbiturat türevidir olarak thiopentalin intravenöz olarak serebral iskemi üzerindeki etkileri bir çok çalışma tarafından ortaya konulmuştur[12-18]. Thiopentalin beyindeki başlıca etkileri beyin metabolizmasının yavaşlatılması (gram başına düşen oksijen metabolizmasının azaltılması), beyne giden kan akımının azaltılması ve intrakranial basıncın azaltılmasıdır[18]. Thiopental yıllar içinde akut beyin hasarında barbiturat koması için kullanılmış ancak daha sonraki çalışmalarda thiopental komasının komplikasyonları ortaya konulduktan sonra bu uygulamadan vazgeçilmiştir[19]. Bu yan etkiler arasında arteriyel hipotansiyon, hipokalemi, solunum komplikasyonları, enfeksiyonlar, hepatik ve renal disfonksiyon görülmüştür[19]. Bu yan etkiler morbidite ve mortaliteye sebep olabilmektedir[19]. Bu çalışmadaki amacımız öncelikle PNM kullanılarak geçici iskemi modeli oluşturulması ve thiopentalin intraarteriyel verilerek düşük dozlarda da beyin protektif etkisinin sağlanması ve düşük dozlarda oluşabilecek komplikasyonlardan kaçınılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Transkateter embolizasyonun tarihçesi

1930 yılında ilk defa Brooks tarafından terapötik embolizasyon yapılmıştır[20]. 1953 yılında Seldinger kendi ismini vermiş olduğu metoduyla angiografinin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini kanıtlamıştır[21]. Kateterizasyon ile embolizasyonun modern olarak Charles Dotter ve arkadaşları tarafından temelleri atılmıştır[22]. Dotter ve arkadaşları girişimsel radyolojinin bir çok uygulamasını ilk deneyenler olmuşlardır . Bunlardan başlıcaları akım yönlendirici balon kateter uygulaması, çift lümenli balon kateter, güvenlik kılavuz teli, perkütan arteriyel stentleme, kateter ile embolizasyondur[22]. Dotter ve arkadaşları embolizan ajan olarak otolog pıhtı kullanmış ve bunu ilk defa gastrointestinal

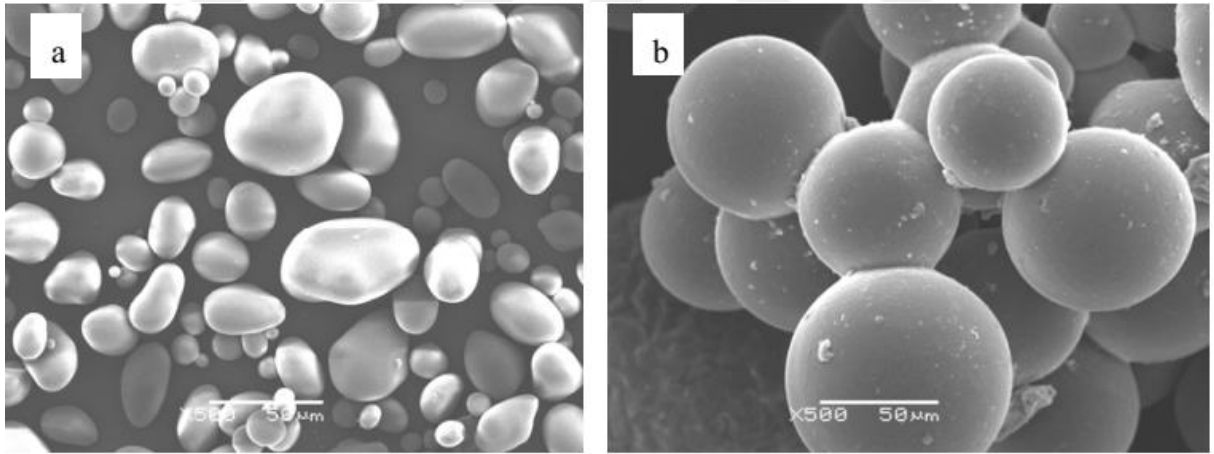
kanama geçiren bir hasta üzerinde denemişler ve başarılı olarak kanamayı kontrol altına alabilmişlerdir[23].

Embolizasyon işlemleri yıllar içerisinde gelişerek değişime uğramış ve bir çok embolizan ajan bu yöntemle test edilmiştir[24, 25]. Görüntüleme ve kateter teknolojisinin gelişmesi ile embolizasyon uygulama alanları genişlemiş ve bir çok tedavinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Kemoembolizasyon yöntemi özellikle bir çok kanserin (bunlardan başlıcaları hepatoselüler, akciğer karsinomları ve baş-boyun tümörleri) tedavi standartları içerisine girmiştir. Embolizan ajan olarak ilk otolog pıhtı kullanılırken zamanla gelfoam, polivinil alkol, PNM, balon ve bir çok madde embolize edici ajan olarak kullanılmıştır. PNM'nin randomize olarak transarteriyel kemoembolizasyon aracı olarak ilk kullanıldığı çalışma Patt ve arkadaşlarına ait 1980 yılında yayınlanan bir çalışmadır[26]. Patt ve arkadaşları karaciğer metastazı yapmış kolorektal kanseri olan hastalarda PNM ile kemoterapötik ajanları vererek prognoz açısından karşılaştırmışlardır[26].

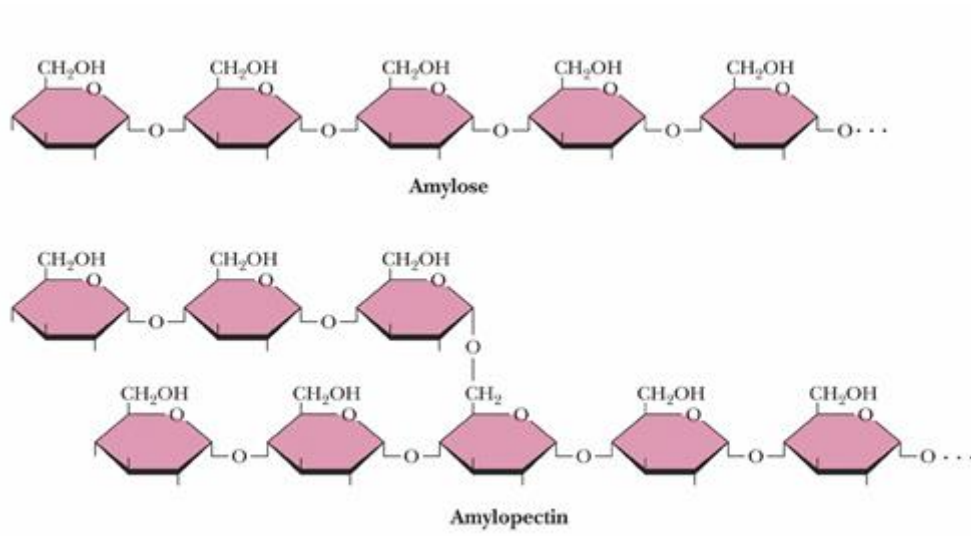
2.2 Parçalanabilir Nişasta mikrokürecikleri (PNM)

Parçalanabilir nişasta molekülleri (PNM) temel olarak amilopektin ve amilozdan oluşmaktadır. Hidrofilik yapıda granüllü moleküllerdir. [1]. Alfa-amilaz enzimi tarafından parçalanan bu partiküllerin ortalama boyuları 20-200 mikrometre arasındadır.[2]. PNM'nin plazmadaki ortalama yarı ömrü 35-40 dakika kadardır.[2]. Yüksek saflıkta hazırlandığında nonimmünojeniktir[27]. PNM molekülleri arteriolar düzeyde tıkanma sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. PNM moleküllerinin arteriyel kan akımını azalttığı bir çok hayvan çalışmasında ve insan üzerindeki bazı tekniklerle gösterilmiştir[25, 28]. İlaçların PNM ile birlikte eş zamanlı verilmesi dokuda lokal olarak yüksek dozlara ulaşılmasını sağlamaktadır[29, 30]. Böylece lokal olarak yüksek doz sağlanırken sistemik olarak düşük dozlarda kalmasından dolayı PNM ile birlikte verilen ilacın yan etkilerinden kaçınılmaktadır[25, 31, 32]. PNM'nin etkisi doku vaskülaritesi, PNM büyüklüğü, A-V şant varlığı nedeniyle kişiden kişiye değişebilmektedir[25, 31]. Minimal metastatik hastalığı olanlarda 300 mg PNM ile tam tıkanma sağlanırken çok vasküler tümörlerde ise 3000 mg PNM tam tıkanmaya yetmemektedir[33]. Başka bir çalışmada Laccourreye ve arkadaşları

tarafından eksternal karotid arterin distali bağlanarak proksimaline gidilerek internal karotid artere mikrokater yardımı ile girilerek yapılmış çalışmada 3 grup oluşturulmuş bir gruba toplam 300000 PNM verilirken diğer gruba 600000 mikroküre verilmiş, kontrol grubuna ise sadece angiografi yapılmış. Sonuçlara bakıldığında belirgin farklar düşük doz ve yüksek doz mikroküre verilen grup arasında görülmüştür. Yüksek doz verilen grupta postoperatif 1. günde mortalite gözlenirken düşük doz verilen grupta oluşan nörolojik sekelin 1 hafta içerisinde toparlanmış olduğu görülmüştür. Histopatolojik olarak yüksek doz grubunda mikroenfarktlar görülürken düşük doz grubunda beyinde herhangi bir enfarkt alanı izlenmemiştir [9]. Tavşanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada bir gruba 1000000 diğer gruba ise 2000000 mikroküre verilerek yapılmıştır. Yüksek doz verilen gruptaki hayvanlar 5 dk içerisinde ölürken düşük doz verilen hayvanlar ise 10 gün yaşadıktan sonra sakrifiye edilmişlerdir. Histopatolojik olarak bu çalışmada iskemi alanı gözlenmemiştir [10]. Bu iki çalışma serebral intraarterial embolizasyonunun ve iskemi üzerine çalışmaların literatürdeki ilk örnekleridir[9, 10].



Şekil 1. Nişasta moleküllerinin çözünmüş(A) ve anyonik olarak görüntüsü (B)[34]



Şekil 2. Nişasta mikroküreciklerini oluşturan amiloz ve amilopektin polimerlerinin kimyasal formülü



Şekil 3. Klinik uygulamada kullanılan PNM'leri

PNM klinik endikasyonları arasında şunlar yer almaktadır:

- Akciğer tümörlerinin kemoembolizasyonu[35]
- Baş-boyun tümörleri[36, 37]
- Hepatosellüler karsinom tedavisi[38, 39]
- Mesane tümörleri[40]
- Kolorektal kanserin karaciğer metastazı[41]
- Pankreatik kanserlerin karaciğer metastazı[42]
- Nöroendokrin tümörlerin ve kolanjiokarsinomların karaciğer metastazları[42, 43]

PNM in hedeflenen organda 30%'dan fazla şant varlığı, arteryel tıkanıklık, portal ven trombozu bulunması durumunda ve portal hipertansiyonda kullanılması kontraendikedir. PNM tedavisi sırasında bazı yan etkiler olabilmektedir. Bunlardan bazıları epigastrik yanma, nefes darlığı (genellikle geçicidir), hedef organ yetmezliği, hedef organ lokasyonunda oluşan ağrıdır(iskemiye bağlı olup genellikle geçicidir) [41]

2.3 Beyin kan dolaşımı ve iskemi patofizyolojisi

Beyin metabolik ihtiyaç olarak vücudun en aktif organlarından birisidir. Beyin toplam vücut ağırlığının 2%'sini oluşturmasına rağmen kabaca kardiyak debinin 20%'sini alırken alınan oksijenin de 25%'ini kullanmaktadır. Bu beslenmenin sağlanabilmesi için de yaygın bir damar ağına sahip olması gerekmektedir. Bu damarsal ağ ana olarak 4 damardan sağlanmaktadır. Bunlar 2 karotid arter ve 2 vertebral arterlerdir. Karotid arterler kaba beynin ön kısmını beslerken, vertebral arterler beynin arka kısmını beslemektedir. Dolayısıyla karotid arterler anterior sirkülasyonu oluştururken vertebral arterler birleşerek baziller arteri oluşturmakta ve vertebrobaziller sistem ise posterior sirkülasyonu oluşturmaktadır. Beyin kan akımının 80%'si karotid arterler tarafından sağlanırken 20%'lik kısmı vertebrobaziller sistem tarafından sağlanmaktadır.

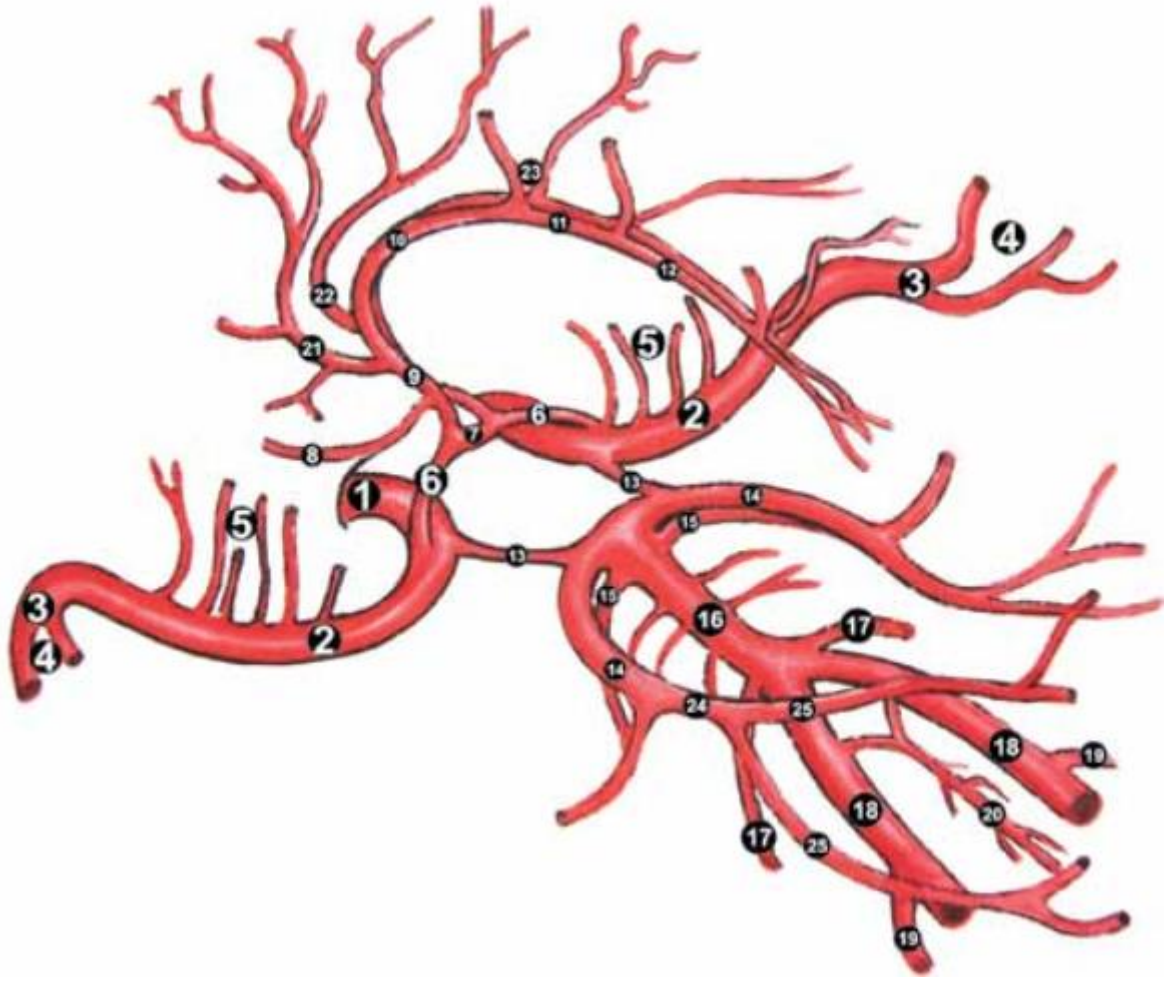
Karotid arterler anterior sirkülasyonda önemli iki dala ayrılır. Bunlar anterior serebral arter ve orta serebral arterlerdir. Posterior dolaşım asıl olarak serebellum, talamus, beyin sapı, mezensefalon ve oksipital lobun beslenmesinden sorumludur. Posterior sirkülasyonda her iki vertebral arter birleşerek baziller arteri oluştururlar. Baziller arter ise prepontine sisterna içerisinde 2 önemli dal verir, bunlar her iki posterior serebral arterlerdir.

Bu iki sistem çeşitli anastomozlarla birbirine bağlanmaktadır. Beyinde başlıca 3 grup anastomatik bağlantı vardır

1-Intrakraniyal anastomozlar: Willis poligonu, kortikal düzeyde serebral arterler arasında, serebellumda ise superior, anterior, inferior ve posterior serebellar arterler arasındadır.

2-Ekstrakraniyal-intrakraniyal anastomozlar: Birinci grupta eksternal karotid arter ile oftalmik arter arasında, ikinci grupta ise eksternal karotid arterin meningeal ve etmoidal dalları ile serebral arterlerin leptomeningeal dalları arasındadır.

3-Ekstrakraniyal anastomozlar: Servikalde vertebral arter ile eksternal karotid arter arasındadır.[44]



Şekil 4: 1- İnternal karotid arter 2- Orta serebral arter M1 dalı 3- Orta serebral arter bifurkasyonu 4- Orta serebral arter M2 dalı 5- Lentikülostriat arterler 6 –Anterior serebral arter A1 dalı 7- Anterior komunikan arter 8- Frontopolar arter 9- Anterior serebral arter A2 dalı 10- Anterior serebral arter A3 dalı 11- Anterior serebral arter A4 dalı 12- Anterior serebral arter A5 dalı 13- Posterior komunikan arter 14- Posterior serebral arter P1 dalı 15- Superior serebellar arter 16- Baziler arter 17- Anterior inferior serebellar arter 18- Vertebral arter 19- Posterior inferior serebellar arter 20- Anterior spinal arter 21- Kallosomarjinal arter 22- İnternal frontal arter 23- Parasentral arter 24- Posterior serebral arter P2 dalı 25 – Posterior serebral arter P3 dalı [44]

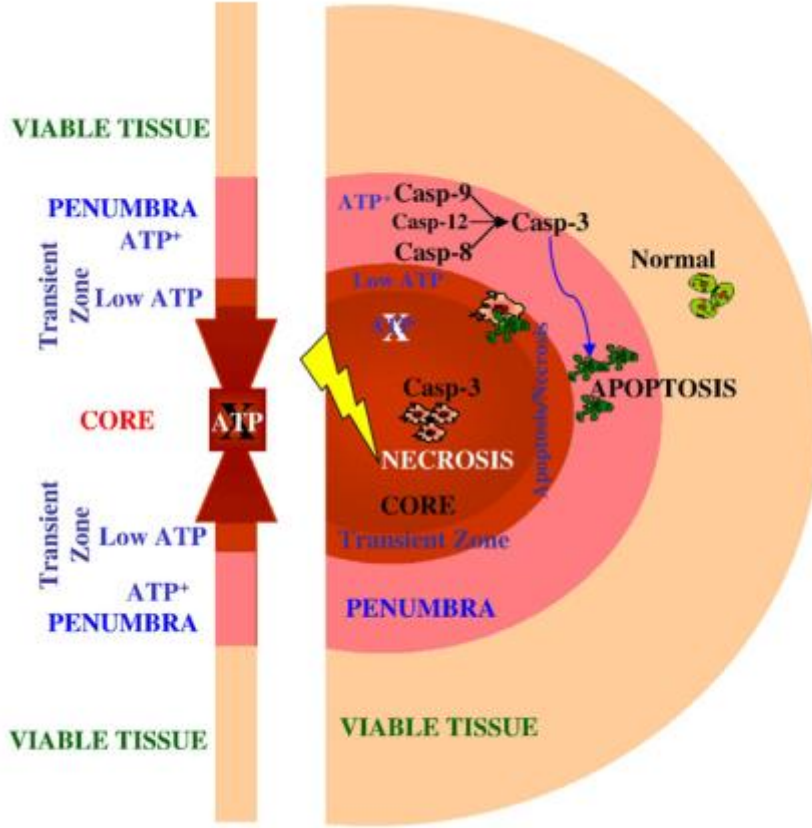
Nöronlar ve glial hücreler, devamlı olarak membran potansiyellerini korumak, transmitter sentezlemek ve depolamak, aksoplazma üretmek ve bozulan yapısal kısımlarını yenilemek zorundadırlar. Bu nedenle beyin hücreleri vücuttaki diğer organlara göre daha yüksek miktarda oksijen ve enerji ihtiyacı duyarlar. Beyin beslenmesinde en önemli etken serebral kan akımı (SKA)'dır. Serebral kan akımını serebral perfüzyon basıncı (SPB) ile serebral vasküler direnç (SVR) arasındaki oran belirler: $SKA = SPB / SVR$. SPB ise ortalama arteriyel basınç (OAB)'tan intrakranial basınç (İKB)'in çıkartılmasıyla bulunur. Normal koşullarda SPB sabittir. Fakat kan basıncı ve serebral venöz dönüşü etkileyen durumlar SPB'ni değiştirebilirler. İKB'in yükselmesi SPB'ni düşürmektedir. İKB, OAB'a ulaşırsa SKA bu noktada durur. Beyin dokusuna giden kan miktarının kritik düzeyin altına düşmesi serebral iskemiye neden olmaktadır [45].

Başlıca nöron hücre gövdelerinden oluşan gri cevherdeki normal kan akımının miktarı, 50-70 ml/100 gr doku/dakikadır. Aksonlardan oluşan ve myelin olarak adlandırılan yağlı bir kılıfla kaplı beyaz cevherde ise, kan akımı miktarı 10-20 ml/100 gr/dakikadır. Serebral kan akımı, otoregülasyon olarak adlandırılan bir mekanizma sayesinde 60-160 mmHg gibi geniş bir OAB aralığında sürdürülür. OAB düşük olduğu zaman, beyin arteriyollerinin dilatasyonu ile direncin azaldığı, OAB yükseldiği zaman direnci arttırmak için arteriyollerin daraldığı saptanmıştır . Gerçekten de SVR'ı dolayısıyla SKA'nı en fazla etkileyen durum damar yarıçapıdır. Vazodilatasyonda SVR azalır, SKA artar. Vazokonstrüksiyonda ise SVR artar, SKA azalır . SKA, yavaş dalgalı uykuda, uyanıklık, çeşitli bilişsel ve fiziksel aktiviteler sırasında, toplamda sabit kalmakla birlikte, dinamik bölgesel değişiklikler göstermektedir [45-47]

Beyin için en büyük enerji kaynağı glikozdur. 100 gr beyin dokusu 1 dakikada 30 mmol (5 mg) glikoz tüketmektedir. Bu da yaklaşık 125 gr/gün glikoz eder. Glikoz beyne kolaylaştırılmış transport ile girer. %80'i enerji üretmede kullanılırken, geri kalan kısmı nörotransmitter, protein ve lipid sentezinde kullanılır. Son ürün olarak laktata metabolize olur. Beyindeki glikoz metabolizmasını insülinin etkilemediği düşünülmektedir. Beyin glikozu oksijenli yoldan kullanır ve kesintisiz oksijen desteği gerekmektedir. Yüksek ve düşük kan basınçlarında kan akımı, kan basıncı ile orantılı olarak değişir. SKA sabit kalması için sistemik kan basıncı arttığında, düz kaslar üzerine olan bir etkiyle vazodilatasyon olurken, kan basıncı düştüğünde vazokonstrüksiyon olur. Bu otoregülasyonun yaygın serebral hipoksi, iskemik inme, subaraknoid kanama ve kafa

travması gibi durumlarda bozulması beklenen bir durumdur. Ancak gerçekte bu regülasyonun miyojenik, metabolik ve nörolojik süreçlerin hangisi yada hangileri tarafından oluşturulduğu netlik kazanmamıştır . Serebral kan akımı, karbondioksit kısmi basıncındaki (PaCO₂) değişikliklere yanıt verir. PCO₂'deki her 1 mmHg'lik değişiklik için serebral kan akımı % 4 değişir. Bu durum oksijen ihtiyacı artan alanlarda, kan akımının artmasını garanti altına alır ve beyin aktif metabolizasyon yapana kadar bu durum devam eder. Bununla birlikte önemli düzeydeki iskemide otoregülasyon kaybı olur ve kan akımı kan basıncındaki değişikliklere paralel olarak artar veya düşer. Kan akımı 30 dakika boyunca 20 ml/100 gr/dakikanın altına düştüğü zaman nöronların fonksiyonu durur ancak canlıdırlar. Kan akımı 30 dakika boyunca 10 ml/100gr/dakikanın altına düştüğü zaman geri-dönüşümsüz nöron hasarı oluşur. SKA'nı belirleyen en önemli metabolik faktörler oksijen, karbondioksit ve hidrojen iyon konsantrasyonudur . Oksijen kısmi basıncı (PaO₂) 60 mmHg'nin altına indiği durumlarda SKA artmaktadır. PaO₂ 40 mmHg'nin altına inerse bilinç etkilenir. 20-30 mmHg'nin altında ise koma görülür. PaCO₂'nin düşmesi SKA'nı azaltırken, PaCO₂'nin yükselmesi SKA'nı artırır. PaCO₂'nin 20-25 mmHg düzeyine inmesi SKA'nda %40-45'lik bir azalmaya neden olur. PaCO₂'nin 80 mmHg'nin üzerine çıkması, anestezi altındaki hayvanlarda SKA'da %100-200'lük bir artışa neden olurken, uyanık hayvanlarda SKA'nın bazal değerine göre 6 katlık bir artış söz konusudur . Hipotermide, CMRO₂ (serebral oksijen metabolizma hızı) azalır. Her 1 °C'lik düşüşte CMRO₂ de % 6-7'lik bir azalma olur. Yaklaşık 20 °C'lik hipotermide Elektroensefalografide (EEG) tam bir süpresyon görülürken 18 °C'lik bir hipotermide CMRO₂ normal değerinin % 10'undan daha düşük bir düzeye inmektedir. Hipertermi, CMRO₂'yi artırır. Fakat 42 °C'den sonra CMRO₂ dramatik olarak azalır [45-47].

2.4 Serebral İskemide fizyopatoloji

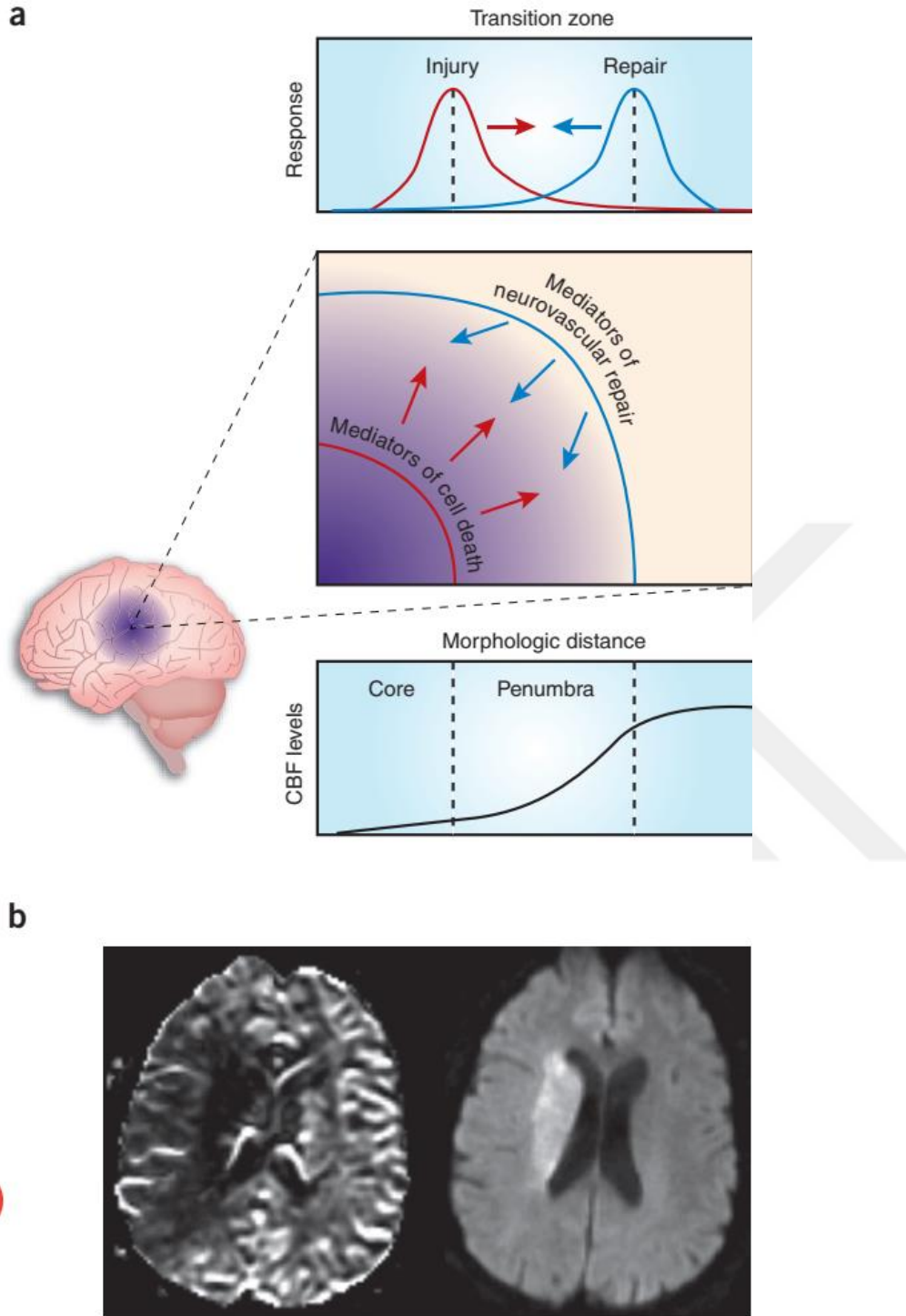


Şekil 5 : İskemi varlığında beyin hasarı oluşumu ve basamakları[48]

Serebral iskemi serebral damarlarda oluşan tıkanıklık veya kan akımında azalma durumunda oluşan beyin dokusundaki oksijen ve diğer metabolitlerin azlığı durumu olarak tanımlanmaktadır [49]. Erişkin popülasyonda iskemik inme ölümlerin en sık nedeni olmaktadır[4]. Serebral iskeminin etkilediği 3 zone bulunmaktadır. Bunlardan birincisi iskeminin etkilediği merkez (core)'dur. Bu alanda nöronal hücreler geri dönüşümsüz olarak nekroza uğrarlar. İkinci alan ise merkezin etrafında bulunan kollateral kan akımının varlığı sebebiyle kan akımının daha az olduğu ve hücre nekrozunun geç geliştiği bölümdür. Merkez ile bu alan arasında ise bir geçiş zonu bulunmaktadır. Bu alandaki hücreler ise kan akımının düzelmediği hallerde nekroza giderek core nekroz alanının genişlemesine sebep olmaktadır[50]. Bu alan penumbra olarak adlandırılmaktadır. Akut iskeminin tedavisindeki

asıl amaç henüz nekroza gitmemiş ve geri döndürülebilir alan olan penumbrayı kurtarmaktır[51]. Penumbranın nekroza gitme zamanı iskeminin süresi ve var olan kollateral kan akımının miktarına bağlı olarak değişmektedir. Nekrotik merkezde kan akımı 100 gr beyin dokusu başına 7ml/dakika'nın altına düşmektedir. Kan akımının bu düzeylere ulaşması oluşan hasarı geri dönüşümsüz hale getirir. İskeminin geri dönüşümlü olduğu alan olan penumbrada ise kan akımı 100 gr beyin dokusu başına 7-17ml/dakika olacak şekilde değişmektedir. Bu miktardaki kan akımı ile penumbra metabolik olarak aktif olarak kalırken elektriksel aktive gözlenmemektedir[52, 53].





Şekil 6 : a) penumbra b) penumbranın manyetik rezonans görüntüsü.[54]

2.5 İskemi patofizyolojisi

Serebral iskemi patolojik süreçlere sebep olabilecek hemodinamik, biyokimyasal veya nörofizyolojik değişimlere sebep olmaktadır. Serebral iskemi varlığında öncelikle nöron fonksiyonu ilk olarak etkilenirken , iskeminin devam etmesi ve ilerlemesi durumunda metabolik olarak etkilenme ortaya çıkmaktadır. Bu metabolik aktivite nöronal yapının korunması için gereklidir[55]. Bu süreç hem nöron koruyucu yolları hem de nöron hasarına sebep olan yolları aktive etmektedir. Bu süreçlerin aktive olması iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak değişmektedir. İskemi sonrası oluşan süreçlerden bazıları şunlardır: glutamat aracı eksitotoksiste, kalsiyum sitotoksiste , oksidatif stres, sinyal iletimi ile oluşan stres, enflamasyon, gen ekspresyonu ve apoptozdur.

Glutamat memeli beyinde ana eksitatör nörotransmitterdir. Glutamat hücreler arası iletişim, nöronal plastisite, büyüme ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Normal olarak glutamat hücre içinde mikromolar düzeyde yer alır ve postsinaptik inotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinden iletimi başlatmaktadır. İnotropik reseptörlerin aktivasyonu sodyum, potasyum ve kalsiyum geçirgenliğini artırırken, metabotropik reseptörlerin aktive olması kalsiyumun mobilizasyonuna sebep olmaktadır. Serebral iskeminin sonrasında aşırı glutamat salınımı ve sonrasında astrosit fonksiyonlarının kaybolmasıyla ve glutamatın astrositler tarafından alımının bozulması sonucu serebral hasar ortaya çıkmaktadır[56-59].

Periinfarkt depolarizasyon merkez alandan çevredeki penumbra dokusuna yayılan spontan oluşan dalgalardan oluşmaktadır. Bu dalgalar muhtemelen glutamat, kalsiyum veya potasyumun salınımından dolayı oluşmaktadır. Merkezdeki hücrelerde anoksik depolarizasyon ortaya çıkarken çevre dokularda hem depolarizasyon hem de repolarizasyon olabilmektedir[55, 60]. Bu depolarizasyonların sayısı ile enfarkt alanının genişlemesi arasında doğru orantı bulunmaktadır[61]. Depolarizasyon dalgaları hayvan çalışmalarında gösterilmiş olmakla birlikte insan çalışmalarında da gösterilmiştir[62]. Buna bağlı olarak da depolarizasyon dalgalarını azaltabilecek tedavi ile birlikte enfarkt alanının genişlemesi önlenmektedir[60].

Kalsiyum hücre içerisinde hücre farklılaşması, enzimatik reaksiyonlar ve büyüme gibi bir çok fonksiyonda rol almaktadır. Bunların yanı sıra kalsiyum nörotransmitter salınımında, hücre uyarılabilirliği ve sinaptik plastisite üzerinde görev almaktadır.

Glutamat salınımı ile birlikte ortaya çıkan aşırı kalsiyum bir çok metabolik kaskadı aktive etmektedir. Aktive olan proteaz, lipaz ve endonükleaz enzimleri hücre ölümüne sebep olmaktadır[56].

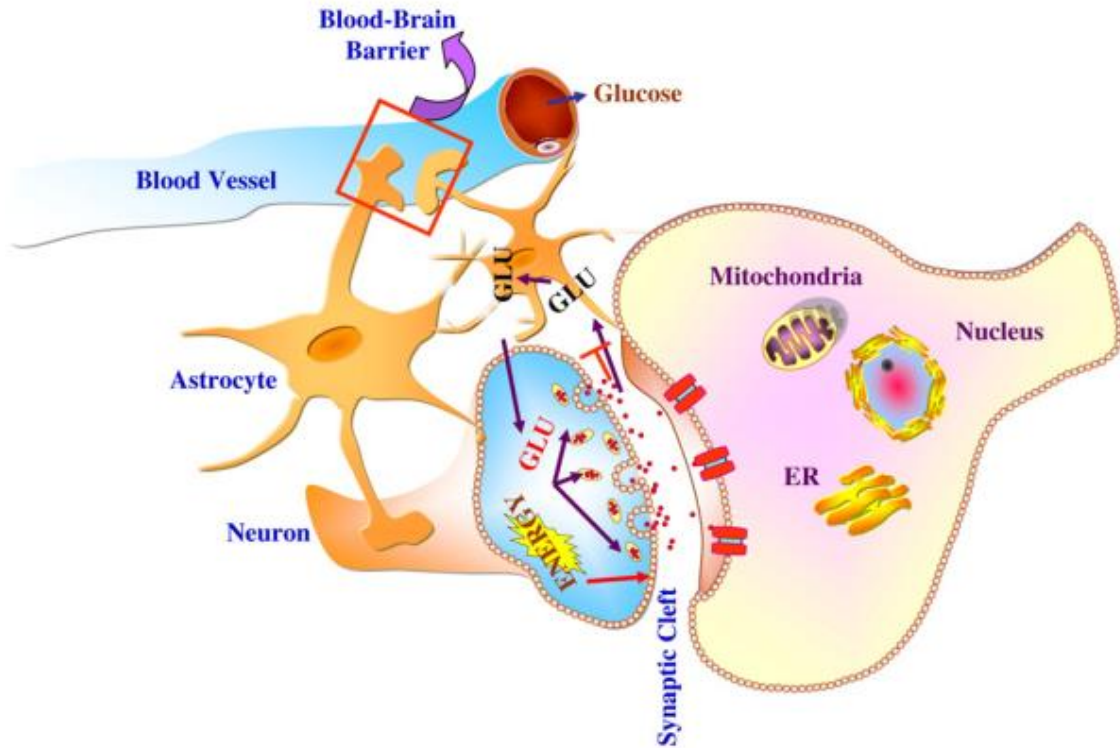
Sinapsların postsinaptik organizasyonu glutamat reseptörlerinden oluşmaktadır. Postsinaptik organizasyon diğer mediatörlerinde eksitasyonuna sebep olur. Bu da hücrenin fazla eksitasyona girmesine sebep olur ve tekrarlayan eksitasyonlar ile birlikte hücre ölümüne doğru seyreden bir süreç başlamış olur[63].

Kalmodulin kalsiyum bağlayıcı bir protein olup nöronal hücrelerde sinyal yollarında kalsiyum/ kalmodülün bağımlı kinazları (CaMK) aktive eder. Kalsiyum kalmoduline bağlanarak molekülde değişikliğe sebep olur. Kalmodulin inhibisyonunun geçici ve kalıcı iskemi enfarkt hacmini azalttığı gösterilmiştir[64]. CaMKII kalsiyum bağımlı bir kinaz olup, vücutta nörotransmitter sentezlenmesi ve boşaltılması, nöroreseptörlerin ve iyon kanallarının modülasyonunda, gen ekspresyonunda ve nöronal büyümede görev almaktadır[65]. Her iki karotid arter ya da 4 damar tıkanıklığının olduğu durumlarda 5 dakikalık iskemi sonrasında CaMKII seviyesinin düştüğü gözlenmiştir[66]. Bu protein seviyesinde düşüklüğün CaMK RNA sentezine bağlı olmadığı posttranslasyonel modifikasyonlara bağlı olduğu gösterilmiştir[67]. CaMK'nın nöronal sağkalımı ve korunmasını desteklemekte olduğu gösterilmiştir[68].

Serebral iskemi ve reperfüzyonu serbest radikaller oluşturarak oksidatif stres oluşturmaktadır[69]. Beyin yüksek lipid yoğunluğundan dolayı serbest radikal hasarına karşı çok duyarlıdır. Oksidatif stres sırasında serbest radikal oluşumunun serbest radikalleri temizleyen enzimlerin kapasitelerini aştığı gösterilmiştir. Serbest radikalleri temizleyen enzimlerin başlıcaları superoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutathion peroksidazdır. Serbest radikallerin hücrede birikmesinin DNA, hücre membranının protein ve lipid yapılarında hasar oluşturduğu görülmüştür[70]. Oksidatif stresten sorumlu olan ana serbest oksijen radikallerin başlıcaları şunlardır: süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH \cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2), NO ve ONOO $^-$. Normal süreçte serbest oksijen radikallerin oluşumu normal bir süreç iken iskemi varlığında NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ve sonucunda oluşan serbest radikal oluşumundaki artış (özellikle NO) hücre hasarına sebep olmaktadır. Daha sonrasında ksantin ve hipoksantin ksantin oksidaze enzimi tarafından yıkılarak superoksitler oluşturması hücre hasarını arttırmaktadır[71]. Araknoidik asidin oksidasyonunun serbest oksijen radikalleri oluşumundaki başlıca kaynaklardan birisi

olduğu düşünülmektedir[72]. Serbest radikaller ayrıca mitogen ile aktive olan kinazları da aktive ederek hücre hasarını arttırmaktadır[73]. Bazı çalışmalarda antioksidan enzimlerin ve metabolitlerin alınmasının oksidatif strese karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir[74]. Sonuç olarak oksidatif stresin ek çok yol ile hücresel hasara yol açtığı gösterilmiştir. Bu etkileri azaltmak için oksidatif yolları inhibe edici bir çok molekül üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Serebral iskemi aynı zamanda hasar mekanizmalarını aktive ederken bir yandan da koruyucu kaskadları aktive etmektedir. Özellikle mitojen aracılı bir kaskad olan MAPK'ı aktive etmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki MAPK iskemi sonrasında hücre kurtulmasında önemli bir rol oynamaktadır[75]. Bu MAPK ailesinin 3 ana üyesi: ERK, p38 ve c-jun'dur. Bu üç sinyal proteini hücre sağkalımında önemli bir rol oynarken aynı zamanda da angiogenezi aktive etmektedir[76].



Şekil 7 : Nörovasküler ünite [50]

Beynin normal çalışması için gerekli olan nörovasküler ünite mikrovasküler endotel, astrosit, nöronlar ve ekstrasellüler matriksten oluşmaktadır. Nöronal hücrelerin çalışmasında kan beyin bariyeri önemli bir yer alır. Kan beyin bariyerinin en önemli komponenti olan mikrovasküler endotel sıkı bağlantılar oluşturarak sıvı tutmayı sağlamaktadır[77]. Sıkı bağlantılar okludin-1, klaudin, zona okluden 1 ve 2 den oluşmaktadır. Bu proteinler sıkı bağlantıların ekstrasellüler matriksle olan bağlantısını kurarak çatısını oluşturmaktadır. Endotel hücreleri özelleşmiş bir ekstrasellüler matriks ve bazal laminadan oluşmaktadır. Bu bazal lamina özellikle tip IV kollojen, laminin, fibronektin, entaktin, trombospondin, heparan sülfat ve proteoglikanlardan zengindir[78]. Serebral iskemi kan beyin bariyerindeki sıkı bağlantıların gevşemesine ve bazal laminanın yıkımına sebep olmaktadır[79, 80]. Bazal laminanın matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından yıkıldığı düşünülmektedir. Serebral iskemi de MMP-1 ve MMP-2(gelatinaz A ve B) bazal lamina degradasyonuna sebep olarak astrositler endotel hücreleri ile olan bağlantıların kaybına ve hemorajik transformasyona sebep olmaktadır[81]. Bu metalloproteinazların iskemiden saatler sonra yükseldiği deneysel çalışmalarda gösterildiği gibi insan beyin hücrelerinde de gösterilmiştir[82]. Serebral iskemi kan beyin bariyerinin değişmesine ve lökosit birikmesine , adhezyonuna ve transmigrasyonuna sebep olmaktadır. Bu olaylar ise inflamatuvar kaskadları aktive etmektedir. Sonuç olarak nörovasküler ünitenin herhangi bir komponentinde oluşan hasar inflamatuvar hücrelerin birikmesine neden olup hücre ölümüne giden bir dizi olayı tetiklemektedir[74, 83].

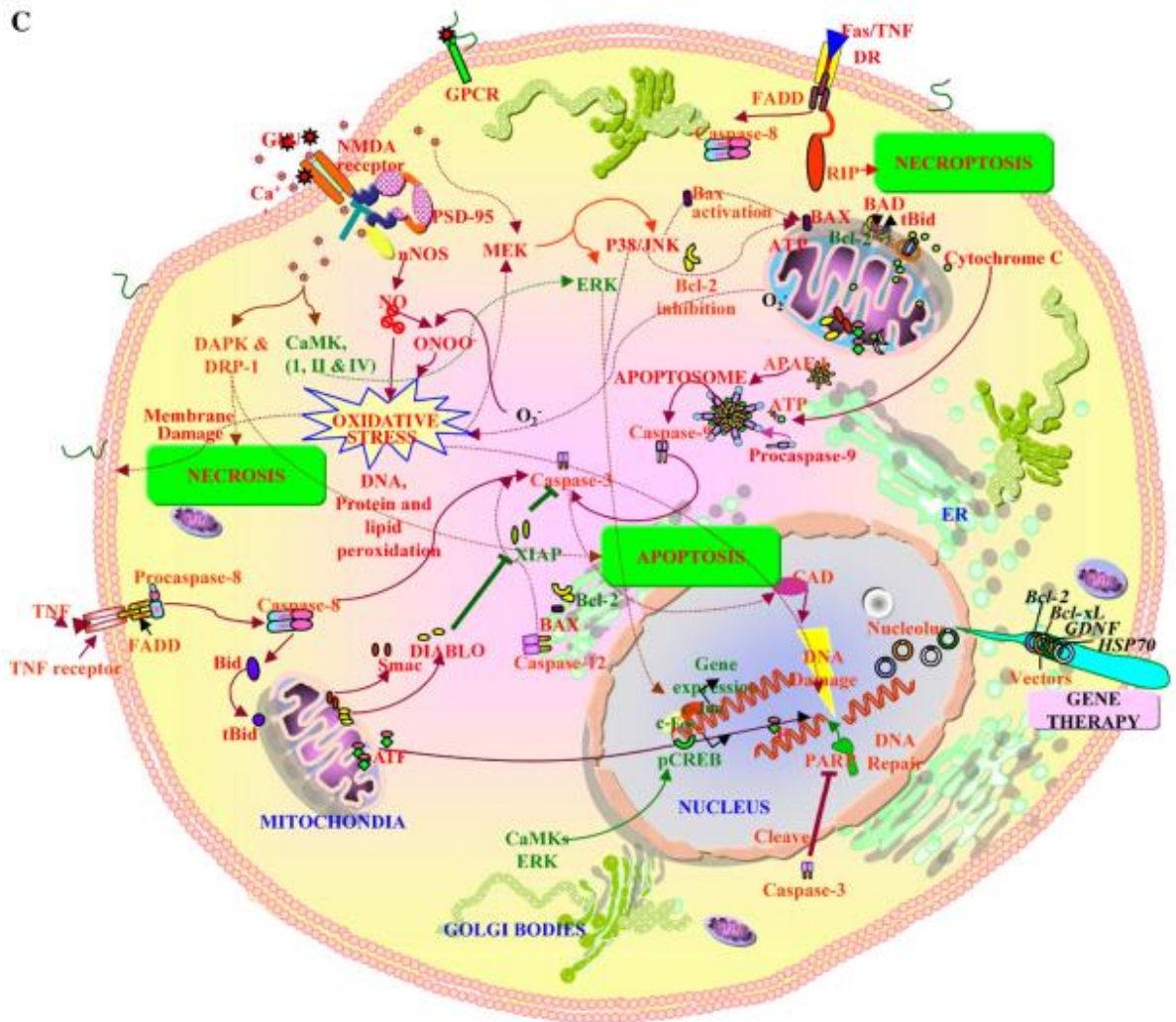
Enflamatuvar olaylar iskemik olaydan birkaç saat sonra başlar ve iskemik hasardan sonraki enflamatuvar hasarın oluşumu bu mekanizmayla açıklanmaktadır. İskemiden hemen sonra salınmaya başlayan sitokinler, adhezyon molekülleri, beyin kaynaklı indüklenebilir nitrik oksit sentetaz inflamasyonun ana sorumlu etkenlerdir ve geri dönüşümsüz hasara sebep olmaktadır. İntegrin, selektin ve immünglobulinler lökosit migrasyonu için gerekli hücreler arası etkileşimi sağlamaktadır. Selektinlerin iskemi ve reperfüzyon sonrası endotel hücresinde ekspresyonu artmakta bu da lökosit migrasyonunu ve enflamasyonu arttırmaktadır[84]. Selektinlerin inhibisyonunun sağlanmasının iskemi sonrası lökosit infiltrasyonunu azalttığı, nörolojik fonksiyonda iyileşme sağladığı ve serebral kan akımında iyileşmeye neden olduğu görülmüştür[85]. Lökosit migrasyonu sadece

selektinlere bağılı olmamakla birlikte yüzeylerindeki lökosit adhesyon molekülleri olan B2 integrin ve LFA-1'e bağılı olabilmektedir[86]. Enflamatuvar hücreler penumbranın mikrodamar yatağında birikerek mikrosirkulasyonun bozulmasına ve iskeminin artmasına sebep olmaktadır[87]. Benzer olarak sitokinler iskemi sonrası enflamatuvar süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlileri IL-1, IL-6, TNF- α 'dır. IL-1'in geçici veya kalıcı iskemi sonrası arttığı gösterilmiştir[88]. IL-1 asıl etki mekanizması nitrik oksit sentezini arttırması, araşidonik asit salınımını arttırması ve NMDA eksitotoksisiteyi uyarmasıdır[89]. Orta serebral arter oklüzyonu olan farelere interaventriküler olarak interlökin- 1 verilmesinin enfarkt alanını, ödem miktarını ve nötrofil birikimini arttırdığı gözlenmiştir[90]. Bu bilgidan yola çıkarak yapılan çalışmalarda interlökin 1 inhibitörlerinin iskemi sonrasında kullanıldığında nekrotik hücre sayısında azalma ve beyin hasarında azalma olduğu gösterilmiştir[91]. Başka bir sitokin IL-6 oklüzyon sonrası 3. saatte artmaya başlar ve 12. saatte pik seviyesine ulaşır ve en az 24 saat boyunca seviyesi yüksek olarak seyreder[92]. Başka bir sitokin olan TNF- α nın iskemik inme geçiren hastaların beyin omurilik sıvısında arttığı gösterilmiştir [93].

Astrofitler beyindeki en çok bulunan hücre grubudur. Nöronlara metabolik ve tropik destek sağlamaktadırlar. Kan beyin bariyerinin oluşumuna katılmaktadırlar. Ayrıca astrofitler beyindeki en yüksek antioksidan taşıyan hücrelerdir[94, 95]. Astrofitler iskemi sonrasında bazı büyüme faktörlerinin salınmasına ve nörogeneze yol açar ve kronik safhada rejenerasyonu sağlaması sebebi ile kısa dönem koruma sağlamaktadır[96]. Merkez kor içerisindeki astrofitlerin bir kısmının canlı olduğu gösterilmiş bu da astrofitlerin nöronlara göre strese daha dayanıklı olduğu görülmüştür[97]. Ayrıca astrofitler glial skar oluşumunda rol oynamaktadır. Bu skar oluşumunun amacının hasar görmüş hücrelerin içerisinde canlı hücreleri korumak olduğu düşünülmektedir[96]. İskemik olayın şiddeti astrofit fonksiyonlarını engellemekle birlikte iskemi sonrası astrofitlerde olan şişme özellikle mikrodamarlanmanın etrafında olduğu astrofit ayaklarında olmaktadır[98].

İskemi sonrası hücre geleneksel olarak nekrotik vasıfta olarak bilinirdi. Ancak geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda bunun böyle olmadığı enfarkt sonrası ilk saatlerde penumbra ve perenfarkt zonda geçici geridönüştürülebilir iskemi görülmektedir, iskemi devam etmesi üzerine bu alandaki hücreler de geri dönüşsüz olarak apoptoza gitmektedir[99]. İskemi sonrası beyin hücresindeki değişim geri döndürülebilir bir süreçten nekroza kadar değişmektedir. Beyin hücresindeki nekrozun sınırları belirgin olmamaktadır. İskemi

sonrası hücrelerde şişme meydana gelir ve hücre içine su geçişi olur[100]. En sonunda hücre rüptüre olur ve hücre içeriği çevreye saçılır. Saçılan hücre içeriği enflamatuar cevap oluşturur. Nekrotik hücrelerdeki DNA fragmentasyonu bir seri kaspazı aktive ederek enflamasyona sebep olur[101]. İskemi sonrası nöronal hasar gecikmiş nöronal dejenerasyonun en karakteristik özelliklerindedir. İskemi sonrası apoptozun aktif bir proses olduğu ve bu proseste yeni proteinlerin sentezlendiği gösterilmiştir [99]. Apoptotik sinyaller hücre içerisinde uyarılana kadar sessiz olarak kalmaktadır. Apoptotik sinyal yollarındaki bozukluk patolojik durumlara sebep olmaktadır. Apoptozun hiç olmadığı kanser ya da apoptozun arttığı iske mi gibi durumlar apoptotik sinyal yolağındaki bozukluklardan meydana gelir. Apoptoz bir çok mekanizma üzerinden oluşan kompleks bir olaydır. Hücre apoptozu sinyal aracılı, mitokondri aracılı, ölüm reseptörü aracılı, kaspaz bağımsız ve kaspaz bağımlı, serbest radikal aracılı olabilmektedir[102].



Şekil 8 : Serebral iske mi sonrası hücre içi sinyal yolları[48]

2.6 Deneysel Serebral İskemi Modelleri

Serebrovasküler hastalıkların % 80-85'ini oluşturan iskemik inme, nörolojik hastalıklar içerisinde en sık görülen ve en çok ölüme neden olan hastalıktır. Serebral iskeminin klinik pratikteki önemi, değişik biçimlerdeki deneysel iskemi modellerinin geliştirilmesini gündeme getirmiştir [5]. Geçtiğimiz yıllar içerisinde geliştirilen iskemi modelleri iskemi patofizyolojisini anlamamızı sağlamıştır ve bu bilgi üzerinde tedavi protokollerinin geliştirilmesi için bir çok çalışmada kullanılmıştır. Hayvan modeli tasarlanırken en önemli olaylardan birisi yapılan modelin insan hastalığına en yakın model olmasıdır. Hayvan deneylerindeki diğer sorunlar ise değişkenlerin kontrol edilememesinden ve gruplar arasındaki homojenitenin sağlanamamasından kaynaklanır. Ayrıca iskemi modellerinde değişkenlerin başlıcaları: yaş, cinsiyet, ırk, plazma glukoz konsantrasyonu, sıcaklık, kan basıncı ve kan gazları gibi fizyolojik değişiklikler, cerrahinin tekrarlanabilmesi, anestetikler, hayvanların boyutları ve maliyetleri gibi diğer çeşitli değişkenler deneysel modeli etkilemektedir[103, 104]. Transgenik hayvanların veya knockout hayvanların kullanılması mekanizmaları daha iyi anlamamızı sağlamıştır. Hayvan türlerinin arasında hatta aynı türlerin farklı cinsleri arasında iskemiye karşı farklı yanıtlar alındığı bilinmektedir. İskemi modelleri hem invitro hem de in vivo olabilmektedir. İn vitro modeller arasında hücre kültürü çalışmaları yer almaktadır. Hücre kültürlerinde iskemiye benzer koşullar oluşturularak (gerek kimyasal gerekse metabolik olarak) iskemi patofizyolojisi anlaşılmaya çalışılmaktadır[105]. İn vivo modeller ise tekrarlanabilirliği, kontrol edilebilirliği, iskemi patofizyolojisini daha rahat yansıtabilmesi açısından daha kullanışlı modellerdir. Ayrıca tedavi seçeneklerinin de denenebilmesi açısından in vivo hayvan deneyleri daha sık karşımıza çıkmaktadır. Tavşan, sıçan, fare, gerbil gibi birçok laboratuvar kemirgen türleri deneysel iskemi oluşturmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır[106]. İn vivo iskemik modellerin kullanılmasının başlıca sebepleri arasında şu sebepler gösterilebilir: 1)insan iskemik inmenin belirtilerinin farklılığı, sebeplerinin ve tıkanmanın olduğu anatomik lokasyonun farklılığı sebebiyle 2) histopatolojik, biyokimyasal ve fizyolojik analiz gereksinimi 3) iskemik inmenin ilk dakikalarında oluşan değişimlerin ancak hayvan modelleri ile görülebilmesi 4) iskeminin perfüzyonun incelenmesi için normal bir vaskülatür yapısının gereksinimi[106].

Geçmiş yıllarda bir çok çalışmada daha büyük hayvan grupları (kedi, köpek, primatlar) kullanılmıştır[107]. Son yıllardaki modellerde ise daha çok kemirgenler kullanılmaktadır. Kemirgen çalışmalarının tercih edilmesinin başlıca sebepleri: ucuz maliyetli olmaları, homojen grupların oluşturulabilmesi, serebrovasküler anatomisinin kısmi benzerliği, küçük beyin hacimleri sebebiyle, ve etik olarak kabul edilebilirlik gösterilebilir.

2.6. Kemirgenlerdeki Serebral İskemi Modelleri

Kemirgen iskemi modelleri iki ana başlık altında toplanabilir: 1) global iskemi modelleri, fokal iskemi modelleridir. İskemi birçok farklı teknikle oluşturulabilmektedir.

Kemirgen global iskemi modellerinden başlıcaları:

1) İki taraflı ana karotid arter tıkanması ile ön beyin iskemi modeli: Bu modelde her iki ana karotid arter kapatıldıktan sonra, sistemik hipotansiyon oluşturularak beyine giden kan akımı azaltılmaktadır. İlk olarak 1972 yılında tanımlanmıştır[107]. Bu model yüksek şiddette ön beyin iskemi oluşturulması, ventilasyonun kontrol edilebilmesi, kronik sağkalım çalışmaları için uygunluğu, deney sırasında mortalitenin az olması sebebi ile tercih edilmektedir[108]. Bu modelde hipotansiyon olmadan yeterli iskemi oluşturulamaması, ve anestezi ihtiyacının olması modelin dezavantajları olarak görülebilir[109].

2) İki taraflı ana karotid arter ve vertebral arter tıkanması ile iskemi modeli: Bu model iki aşamalı gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada boyun disseksiyonu yapılarak her iki ana karotid arterin tıkanması ve ardından C1 seviyesinde vertebral arter elektrokoagülasyonudur. Bu model anestezi gerektirmemesi, geçici serebral iskemi oluşturabilmesi sebebi ile tercih edilmektedir. Ancak mortalitenin yüksek olması, kollateral dolaşımın varlığı ve varyasyonu bu modelin uygulanmasındaki zorluklardır[110].

3) Beyin omurilik sıvısı basıncını arttırarak oluşturulan iskemi modelleri: İlk defa Ljungren ve arkadaşları tarafından denenmiş model , sisterna magna içerisine yapay beyin omurilik sıvısı verilerek basıncı 20-70 mm Hg civarına getirilerek beyin içerisinde iskemi oluşturmak ve ATP deplesyonu sağlamaya yöneliktir[111]. Başka bir çalışmada ise unilateral ana karotid arter tıkanması ile birlikte intrakranial basınç arttırılarak iki yöntem birlikte kullanılmıştır[112]. Bu yöntemin en büyük faydası nöbet olmaması ve basınç artışının geri döndürülebilir olmasıdır.

4) Turnike ile iskemi oluşturulması: başka bir yöntemde ise hayvanın boynuna bir turnike bağlanarak, şişirilir. Turnike basıncı çok yüksek seviyeye ulaşıncaya kadar şişirmeye devam edilir(600-700 mm Hg). Böylece serebral kan akımı 1%'nin altına düşer ve iskemi oluşur[113].

5) Dekapitasyon yapılarak iskemi oluşturulması: hayvana ani olarak dekapitasyon yapılarak kafanın 37 derecede bir müddet tutulduktan sonra ani olarak dondurulması şeklinde yapılır. Nadir kullanılan bir yöntemdir. Genellikle metabolik çalışmalarda kullanılır[114].

6) Levine yöntemi: Bu yöntemde tek taraflı olarak ana karotid arter tıklandıktan 24 saat sonra hayvan hipoksik bırakılmaktadır. Bırakılmaması halinde beyin enerji döngüsünde değişme olmadığı gösterilmiştir. Bu yöntemle metabolik yolların incelenmesi amaçlanmaktadır[115]

Kemirgen fokal iskemi modellerinden başlıcaları:

1) Kalıcı veya geçici olabilen modeller: Orta serebral arter (OSA) oklüzyonu , spontan olarak hipertansif olan sıçanların (SHR) kullanımı: Cerrahi bir işlem yapılarak kraniotomi sonrası MCA'nin değişik lokalizasyonlarında oklüze edilerek yapılan modellerdir. İstenilen anatomik lokasyonda tıkanma sağlayabilmesi avantaj sağlarken, cerrahi müdahale sırasında kortikal hasar olabilmektedir[116, 117]

2) Fotokimyasal olarak rose bengal kullanılarak yapılan iskemi modeli: bu yöntem 560 nm dalga boyundaki ışığın intravenöz rose bengal ile tepkimeye girerek vasküler tromboz oluşturmasına dayanan bir modeldir. Bu modelin avantajı trombozu istenilen seviyede oluşturmasıdır[118].

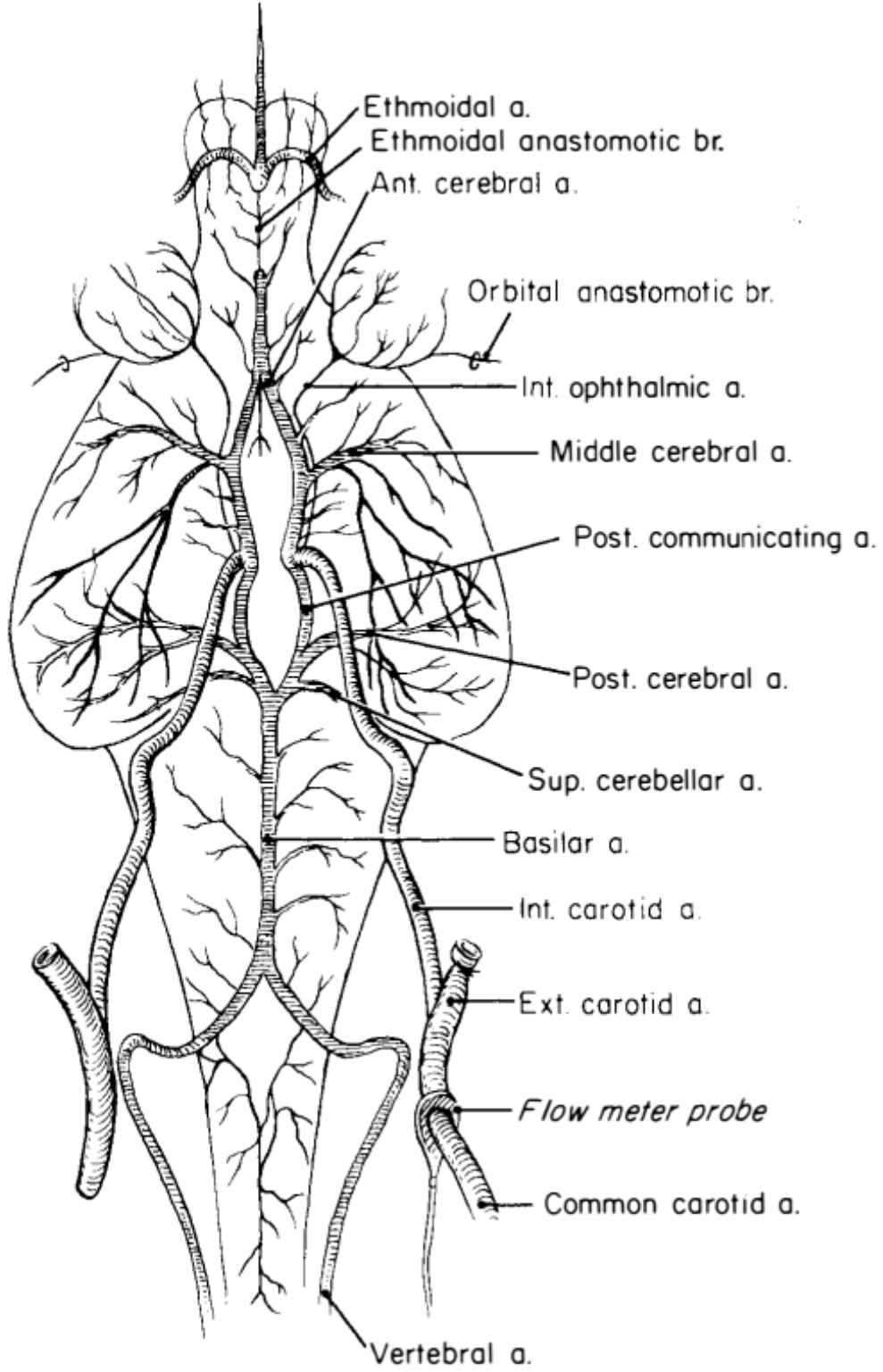
3) Serebral emboli ve tromboz modeli: bu modelde çeşitli ajanlar kullanılarak tromboz ve emboli sağlanmıştır. Bunlardan başlıcaları: kan pıhtısı, nişasta mikroküreleri, araşidonik asittir[10, 119, 120]

2.7. Tavşan Beyninin Vasküler Anatomisi

Tavşan beyin dokusunun beslenmesi karotid ve vertebral arterler tarafından yapılmaktadır. Foramen magnum seviyesinde vertebral arterler birleşerek baziler arteri oluştururlar. Baziller arter oluşmadan hemen önce çevre paraspinal dokulara ve vertebralara çeşitli dallar gönderir. Baziller arterden çıkan dallar serebellum ve beyin sapını beslemektedir. Posterior perforated substance seviyesinde ise her iki dala ayrılarak posterior serebral arteri oluşturur.

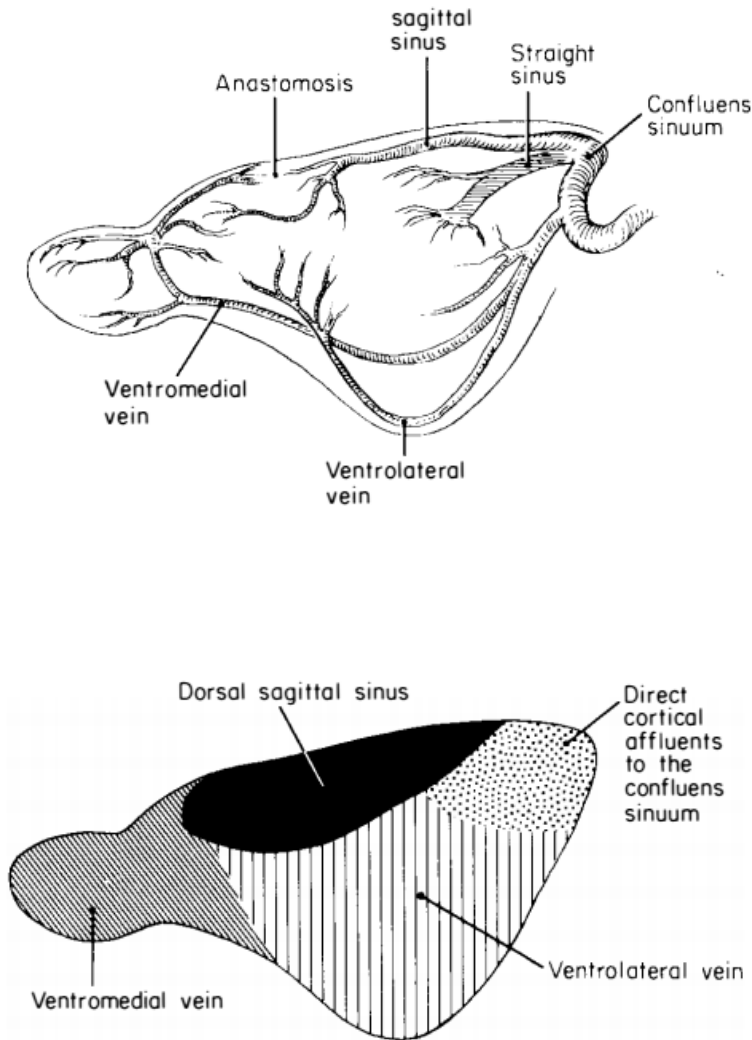
İnternal karotid arterler common karotid arterin dorsal yüzünden ayrılırlar ve önce dorsolateral daha sonra da dorsomedial olarak devam ettikten sonra foramen karoticumdan intrakranial alana girer. Oksipital arter 1/3 oranında internal karotidden ayrılır. İnternal karotid arter willis poligonuna girinceye dek herhangi bir dal vermez(intrapetröz parçada küçük dallar hariç). İnternal karotid arter willis poligonuna optik kiasmanın posterior sınırından katılır ve belirgin olarak gelişmiş bir posterior komunikan arter ile posterior serebral arterlere bağlanır.

İnternal oftalmik arter internal karotid arterin (İCA) intrakranial ilk verdiği daldır. Bu dal koroid pleksusu beslemektedir. İCA sonrasında rostral olarak ilerleyerek orta serebral arter ve anterior serebral arteri oluşturur. Anterior serebral arterler birleşerek tek bir trunk oluşturur bu arter önce rostral daha sonra da kaudal ilerleyerek beyin beslenmesini sağlar. Bu ortak trunk eksternal karotidin bir dalı olan etmoidal arterler ile anastomoz halindedir.



Şekil 9: tavşan beyin arteriyel anatomisinin şematik çizimi[121]

Frontal ve parietal kısımların dorsal ve lateral yüzlerinin venöz drenajı dorsal sagittal sinüse olmaktadır. Dorsal sagittal sinüs olfaktor bulbusun hemen 5 mm gerisinden başlayarak interhemisferik sulkus boyunca devam eder straight sinüs ile birleşerek confluens sinuum'a boşalır. Oksipital korteksin bazen venöz drenajı direkt olarak confluense olabilmektedir. Olfaktör bulbus, frontal pol, serebrumun medial yüzeyi, hipotalamus ventromedial venlerden drene olurlar. Bu venler kaudal olarak ilerlerler lateral venöz yapılarla birleşerek lateral sinüslerde sonlanır. Sonuç olarak beyin venöz drenajı lateral sinüsler daha sonrasında da her iki taraftaki transvers sinüslere dökülür. Buradan da transvers sinüsler aracılığıyla vertebral ve internal jugular venlere emisser venler aracılığıyla ise eksternal jugular venlere dökülürler[121].



Şekil 10: serebral venöz sistemin lateral diagramı[121]

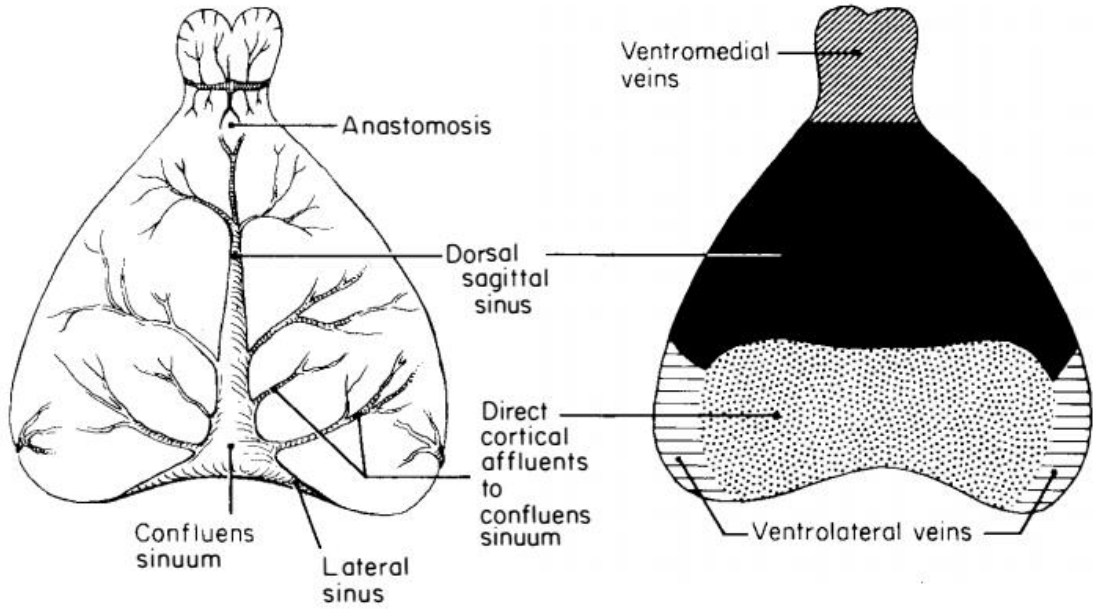
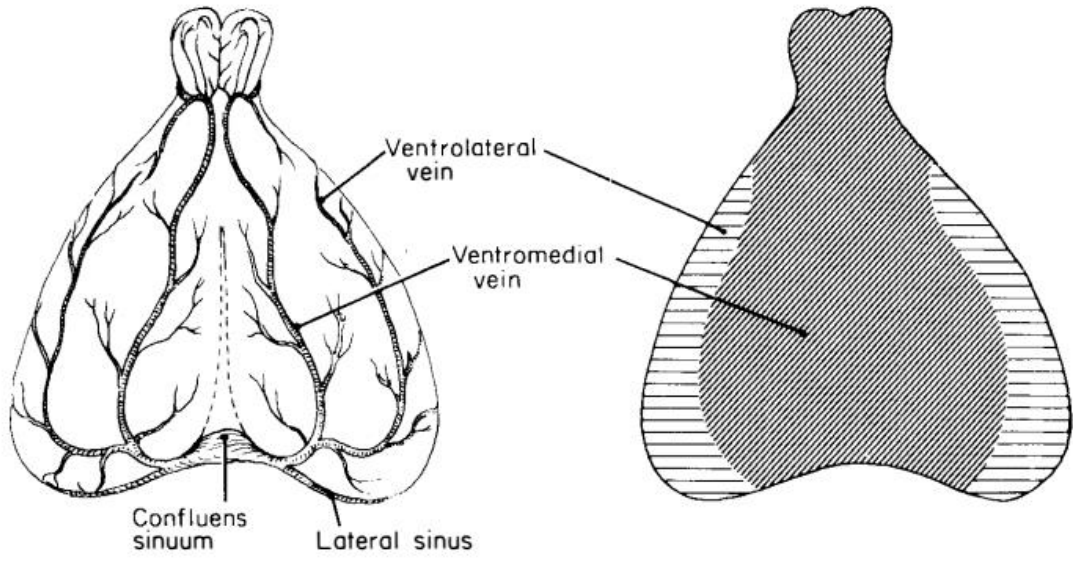


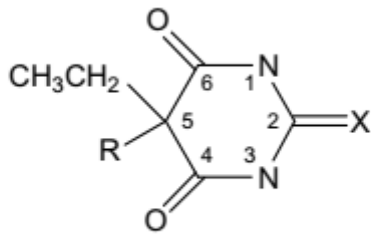
FIG. 9. Same as Fig. 8, dorsal view.



Şekil 11 : serebral venöz sistemin dorsal ve ventral görünümü[121]

2.8. Tiyopental farmakokinetiği ve farmakodinamiği

Tiyopental çok hızlı bir barbitürat türevidir. Şekil 12’de yapısal formülü gösterilmiştir[122]. Barbituratların etkilerinin başlaması ve etkilerinin süresi barbiturat türevinin yağda çözünürlük derecesine bağlıdır[123]. Tiyopental ultra hızlı etkili bir anestezi induksiyon aracı olarak kullanılmaktadır.



Şekil 12: tiyopentalin yapısal formülü

Tiyopental verilmesi doza bağımlı olarak değişik evrelerdeki anestezi basamağını oluşturabilir. Tiyopentalin 9.6 mg/kg(4.5 -9 gr/saat) 1 EEG de değişiklikler meydana getirmektedir[124]. Birinci evrede EEG’de hızlı frekans ve düşük amplitüdü dalgalar gözlenmektedir. Bu evrede deneklerde uyuma başgösterir. Bu evrede göz kapağı reflekslerinde kaybolma görülür ve sesli uyaranlara yanıt kaybolur. Ardından ikinci evre başlar. Bu evrede düşük frekanslı ve yüksek amplitüdü EEG dalgaları görülür. Üçüncü evrede ise EEG’de izoelektrik akım görülür(burst süpresyon). Evre 3 derin anesteziye karşı gelmektedir. Evre 2 ve 3 cerrahi anestezi olarak kabul edilmektedir[124]. Anestezi derinliği arteryel hipotansiyonla doğru orantılı olarak görülmektedir. Çünkü juguler vendeki tiyopental düzeyi ile arteryel hipotansiyonun derecesi benzerlik göstermektedir[125].

Barbitüratların beyin koruyucu etkisi yıllar içerisinde araştırılmış bir konu olup intrakraniyal basıncı azaltmadaki etkilerinin serebrovasküler rezistansı arttırarak serebral kan akımını azaltması aracılığı ile olduğu görülmüştür.[126]. Yüksek doz barbitüratlar metabolik ihtiyaç ile gelen metabolik substratlar arasındaki dengeyi kurabilir. Oksijen

metabolizmasındaki azalma ile serebral kan akımındaki azalma karşılıklı olarak intrakraniyel basıncı azaltmaktadır[127].

Glutamat ana eksitator nörotransmitter olup , membran reseptör etkileşimleri, bilişsel, hafıza, hareket ve duyu gibi fonksiyonlarda görev almaktadır. Ek olarak eksitator nörotransmitterler nöronal plastisite için çok önemli bir yere sahiptir. Bir çok nörolojik hastalıkta nöron hasarından sonraki aşamada glutamat veya aspartatın fazla eksitasyonuna sahip ortak yollar etkilenmektedir[128]. Koruma mekanizmaları arasında serbest radikal oluşumu azaltılması da sayılabilir[129]. Barbitüratların etkinliği asıl sinaptik aktivitenin susturulması veya yavaşlatılması üzerindedir[130]. Elektroserebral sessizlik metabolik baskılanma ile bağlantılı gözükmektedir[131]. Yapılan bir çalışmada tiyopental ile burst süpresyon oluşturulan köpeklerde serebral kan akımında ve oksijen metabolizmasında sırasıyla 55 ve 42% azalma sağlanmıştır. Serebral aktivite tamamen sonlandıktan sonra ek doz barbitürat verilmesi kardiyak instabilite yaratırken kan akımında ve metabolik ihtiyaçta azaltma sağlamamaktadır[131]. Bir çalışmada en sık yan etki olarak 52% arteriyel hipotansiyon (inotrop desteği gerektirecek kadar) görülmüştür. Yine aynı çalışmada kontrol grubuna göre anlamlı bulunan yan etkiler arasında santral sinir sistemi enfeksiyonları, sepsis, ve akut respiratuar distres sendromu bulunmuştur[132]. Tiyopental genel olarak vücutta metabolize olmakla birlikte küçük bir kısmı değişmeden idrarla atılır[133]. Tiyopentalin vücuttan eliminasyon süresi 5 ile 22 saat arasında değişmekle birlikte yağda çözüldüğünden dolayı obez kişilerde bu süre daha da uzamaktadır[134].

Barbitüratların ve anestetik ajanların nöron koruyucu etkisi bir çok çalışma ile ortaya konmuştur[135]. İntraarteriyel anestetik verilmesi nörolojik fonksiyonların belirlenmesi amacıyla wada testi olarak yaklaşık 50 yıldır yapılmaktadır[136]. Yakın tarihe baktığımız zaman ise intra-arterial tromboliz tedavisi iskemik inme tedavisinde önerilmeye başlanmıştır[137]. Yapılan bir çalışmada intraarterial ve intravenöz tiyopentalin karşılaştırılması yapılmış, bu çalışmada intrakarotid olarak verilen tiyopentalin kan basıncında düşmeye sebep olmadığı, daha düşük dozlarda sessiz EEG oluşturabildiği, serebral kan akımında azalmaya sebep olmadığı gösterilmiştir[138]. Aynı çalışmada tiyopentalin intrakarotid olarak verilmesinin hemodinamik stabilitenin korunmasında , serebral perfüzyonun korunmasında katkısı olduğu ve intravenöz yol ile karşılaştırıldığında daha çabuk geri dönüş olması, ve kardiyak dekompresyon yapmaması avantajları olarak belirtilmiştir[138, 139].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya ait deney protokolü Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve 31.10.2017 tarihli oturumda 2017/68-02 karar numarası ile onaylanmıştır.

Bu çalışmada ağırlıkları 2500 ile 3500 gram arasında değişen 25 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Deney süresince tavşanlar standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafeslerde, %50-60 nem aralığında, 17-23 °C de, 12 saatlik karanlık-aydınlık dönüşümünde) tutuldu ve standart yem (ad labitum su ve pellet yem) ile beslendi.

İşlem sonrası 24 saat yaşatılan denekler daha sonra histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile sakrifiye edildi. 5 mikronluk seri kesitler sonucunda elde edilen örnekler hematoksilin & eozin (H&E) ve TUNNEL yöntemi ile boyanarak Leica DM6000B ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.1. Deney Grupları

Deney grupları aşağıdaki gibi planlanmıştır:

Grup 1 (Kontrol grubu, n=5): Bu gruptaki deneklerde sadece santral kulak arterine mikrokaterlerle girildi ve sağ ICA'ya serum fizyolojik (sf) + kontrast madde enjeksiyonu yapıldı.

Grup 2 (PNM ile iskemi grubu, n=5): Bu gruptaki deneklerde santral kulak arterine mikrokaterlerle girildi ve sağ ICA'ya sf + kontrast madde + PNM enjeksiyonu yapıldı. Bu işlem için her bir tavşana anjiyografi eşliğinde 60 mg/ml olan nişasta partiküllerinden akım hızında azalma sağlayabilmek için 0,2 ml yani 12 mg verildi.

Grup 3 (İntrakarotid tiyopental grubu, n=5): Bu gruptaki deneklerde santral kulak arterine mikrokaterlerle girildi ve sağ ICA'ya sf + kontrast madde + İntrakarotid olarak tiyopental yapıldı. Tiyopental dozu deneklerde eş zamanlı yapılan EEG 'de burst

supresyon görülene kadar ilaç verilmeye devam edildi. Toplam ortalama olarak deneklere 12,3 mg tiyopental enjekte edildi.

Grup 4 (PNM ile iskemi grubu + intrakarotid tiyopental grubu, n=5):Bu gruptaki deneklerde santral kulak arterine mikrokatateterle girildi ve sağ ICA'ya sf + kontrast madde + İntrakarotid olarak tiyopental + PNM enjeksiyonu yapıldı. İntrakarotid tiyopental PNM verilmeden hemen önce EEG'de burst supresyon görülene kadar verildi. Burst supresyon görüldükten sonra PNM verilerek tam tıkanmanın olduğu angiografik olarak görüntüledi. Bu işlem için her bir tavşana anjiyografi eşliğinde 60 mg/ml olan nişasta partiküllerinden akım hızında azalma sağlayabilmek için 0,2 ml yani 12 mg verildi.

3.2. Anestezi

Bir gece önceden aç bırakılan hayvanlara genel anestezi ve analjezi sağlamak amacıyla 50 mg/kg ketaminhidroklorür (Alfamin ®) ve ksilazin 10 mg/kg (Alfazyne ®) intramüsküler yolla enjekte edildi. Anesteziden sonra denekler kendi solunumlarına bırakılarak işleme geçildi.

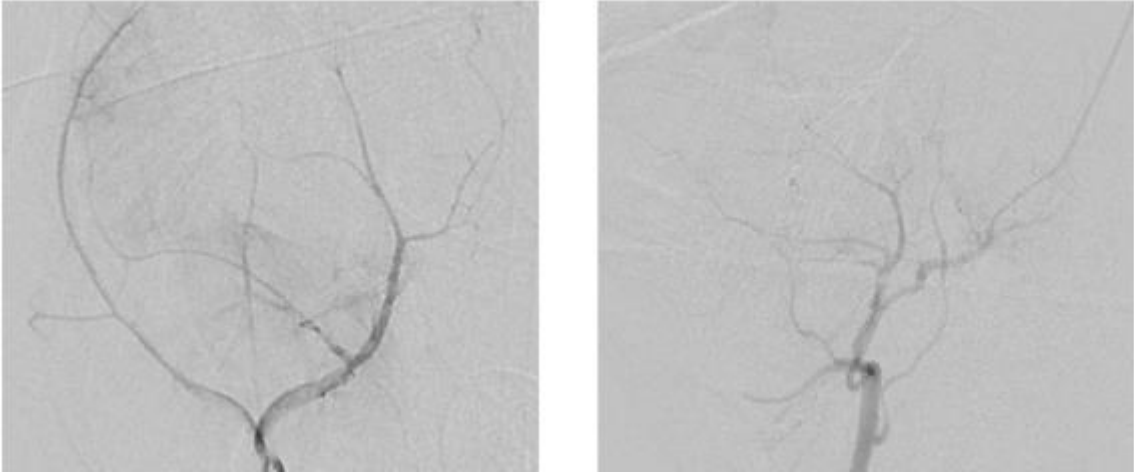
3.3. Trans-arteryal Mikrokatateterizasyon

Serebral anjiyografi için işlem öncesi ketamin ve ksilazin ile sedatize edilen tavşanın kulak dorsal yüzü yukarıya gelecek şekilde yatırıldı ve tavşan fikse edildi. Santral kulak arterinden yapılacak selektif trans-arteryal mikrokatateterizasyon işlemi için, tavşan girişimsel nöroradyoloji ünitesinde Siemens Artis Zee biplane (Erlangen, Almanya) anjiyografi cihazına alındı. Tavşanların kulak arka yüzünde ortada yer alan arter tespit edildi kulak dorsumu tıraş edildikten sonra bu bölge cerrahi işlem için uygun hale getirildi ve antiseptik çözeltilerle yıkandı. Ayak parmağına uygulanan çimdikleme refleksine karşı ayağını çekmeyen denekte, uygun anestezi ve analjezi sağlandığı tespit edildikten sonra 24 gauge yani 0,5106 mm çapındaki sarı intraket ile santral kulak arterine girildi ve arteryal kanın intraket proksimaline doğru hareket ettiği görüldü. Sarı intraketin iğnesi bir miktar geri çekilip intraket bir miktar daha damar içerisine ilerletildi. Damar içinde olduğundan emin olunduktan sonra intraketin mandreni tamamen çekilip içinden Synchro-20.014 mikrotel (StrykerNeurovascular) eksternal karotid artere kadar skopi eşliğinde gönderildi. 24 gauge intraket mikrotel üzerinden çekilip çıkartıldı. Daha sonra tel üzerinden SL-10 mikrokatateter (Stryker Neurovascular) common karotid artere ilerletildi. Tel manipülasyonları ile sağ ana karotid artere girildikten sonra mikrokatateterden Iopromide

(Ultravist ®300 mg/ml, Bayer/Almanya) iyotlu kontrast madde verilerek manuel enjeksiyonlar yapıldı ve serebral anjiyogramlar elde edildi. Bu konsept dinamik görüntüleme modaliteleri kullanılarak gerçekleştirildi.



Resim 1 : Santral kulak arteri



Şekil 13: Tavşan serebral angiografi görüntüleri

3.4. Parçalanabilir Nişasta Mikrokürecikleri Uygulanması

Santral kulak arterinden girildikten sonra önce eksternal karotid ordan da çeşitli manipülasyonlar yardımıyla ana karotid artere ulaşıldıktan sonra eş zamanlı anjiogramlar alındı. Ana karotid arter proksimalinde balon şişirildikten sonra 0.2 ml parçalanabilir nişasta partikülü sağ ana karotid artere verilerek beyinde geçici iskemi modeli oluşturulması amaçlandı. Tıkama işlemi anjiografik olarak ortaya konulduktan sonra kateter çıkarılarak bazı denekler 24 saat gözlem amacı ile kafese alındı.

3.5. Deneklerin Sakrifikasyonu ve dokuların çıkarılması

Trans-arteryal mikrokaterizasyon işlemi sonrası 24. saatte genel anestezi altındaki deneklerin boyun ve ekstremiteleri sertleşinceye kadar sol ventriküllerinden sabit hızla %4 lük paraformaldehit (0,1 mol/L fosfat tamponu içinde, pH:7,4) solüsyonu verilerek perfüzyon fiksasyonu yapıldı ve denekler sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen deneklerin beyinleri, geniş kraniyektomi sonrası mikrodisektör ve mikromakas kullanılarak uygun yöntemlerle çıkarıldı ve histoloji anabilim dalından temin edilen uygun örnek kaplarına konularak %10 lük paraformaldehit içerisinde, oda ısısında immersiyon yoluyla 48 saat postfikse edildi.



Resim 2: Tavşan beyninin mezial görüntüsü



Resim 3 : Tavşan beyninin inferior yüzden görüntüsü



Resim 4 : Tavşan beyninin süperiordan görüntüsü

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Cerrahi olarak çıkartılan denek beyinlerinin her bir hemisferi korteks, hipokampus ve beyincik olmak üzere 3 parçaya ayrılarak 48 saat tamponlu formalinle fikse edildi. Kasetlenen dokular otomatik takip cihazıyla (Leica TP1020) takip edilerek gömülmeye hazır hale getirildi. Takip sonrası parafin bloklara gömülen dokuların 4 mikrometre kalınlığındaki kesitleri sliding mikrotom (Leica SM 2000R) kullanılarak alındı. Beyin korteks bölgesinde apoptoz tayini, DNA sarmal kırıklarının enzimatik olarak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)-aracılıklı deoksiüridin trifosfat ile işaretlemesi (TUNEL) ile Hücre Ölümü Deteksiyon kiti (Chemicon® ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kesitler pozitif yüklü lamlara alınarak 3 saat 60°C derece etüve konularak deparafinizasyona başlandı. Etüvde bekletme sonrası oda sıcaklığına kadar soğutulan kesitler ksilolle üç kere 5'er dakika muamele edilerek deparafinizasyon tamamlandı. Dereceli alkollerle rehidrate edilen kesitlere 15 dakika Proteinaz K ile antijen geri çağırma ardından %3 lük hidrojen peroksitle 5 dakika peroksidaz blokajı yapıldı. Yıkanan kesitler

apoptoz kiti solüsyonları kullanılarak, kitin belirtilen prosedürüne göre TUNEL boyaması gerçekleştirildi. Metil green kullanılarak çekirdekler boyandı. Yıkama sonrası yine dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edilen kesitler, ksilolle şeffaflaştırılıp entellan kullanılarak kapatılıp incelemeye hazır hale getirildi.

Her bir korteks materyalinden alınan kesitlerden 40x lik büyütmede rastgele olarak seçilen 5 alanda tüm hücreler sayıldı. Sayılan toplam sayı içerisinde glia ve nöron sayıları tespit edildi. Toplam glia ve nöronlar içerisinde TUNEL pozitif boyananlar tespit edildi. Leica DM6 B mikroskobu ve Leica DFC 7000T kamerası kullanılarak görüntüler alındı. Ortalamalar ve ortalama yüzdeleri bu sayılar baz alınarak hesaplandı.



Resim 5: Tavşan beyninin koronal olarak kesitleri

3.7 İstatistik Değerlendirme

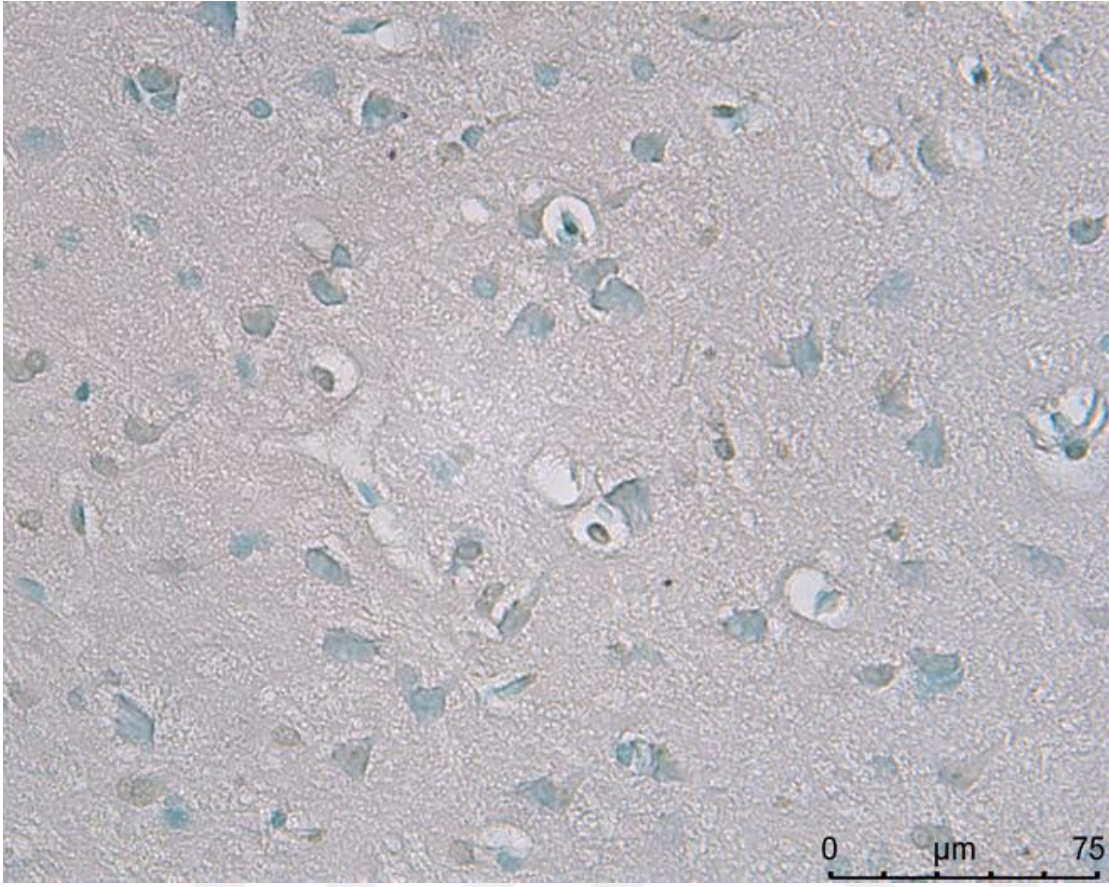
İstatistiksel değerlendirme için bazofilik sitoplazmalı piknotik görünümdeki nöronlar, ‘gruplara kör’ iki histolog tarafından 40X mikroskop büyütmesinde 3 alanda sayıldı ve toplam değerleri alındı. Sayımların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 22.0 programı kullanıldı. Grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, bağımsız iki grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1.1 Kontrol Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme

Kontrol grubundaki hayvan beyinleri 5 bölüme ayrılarak incelendi. Bu gruptaki hayvanların nöron sayımı sırasında 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 0,33 olarak gelmiştir. Bu gruptaki hayvanların 1. Bölgede sadece 2 hayvanda birer apoptotik hücre sayılmıştır. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 0,66 iken 3 hayvanda apoptotik hücelere rastlanmıştır. Bir hayvanda 2 hücre diğer 2 hayvanda ise birer hücre saptanmıştır. 3.bölgede ortalama 0.33 olarak gelirken sadece bir hayvanda 2 apoptotik hücre izlenmiştir. 4. Bölgede ortalama 0,5 bulunurken 3 hayvanda birer apoptotik hücre görülmüştür. 5. Bölgede ortalama 0,5 ve bir hayvanda 2 bir hayvanda ise 1 apoptotik hücre görülmüştür. Bu sonuçlar bize hayvanlara sadece angiografi yapılmasının belirgin iskemi yaratmadığını göstermiştir.

Aynı grubun glial hücreler içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımızda 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 3,5 olarak gelmiştir. Bu gruptaki hayvanların 1. Bölgede sadece 5 hayvanda apoptotik hücre sayılmıştır. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 2,16 iken 6 hayvanda apoptotik hücelere rastlanmıştır. 3.bölgede ortalama 2.33 olarak gelirken 5 hayvanda apoptotik hücre izlenmiştir. 4. Bölgede ortalama 2,66 bulunurken 6 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. 5. Bölgede ortalama 2,5 ve 5 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. Bu sonuçlara baktığımızda glial hücrelerdeki apoptotik hücrelerin nöron hücrelerinden daha fazla olduğu görülmüştür.

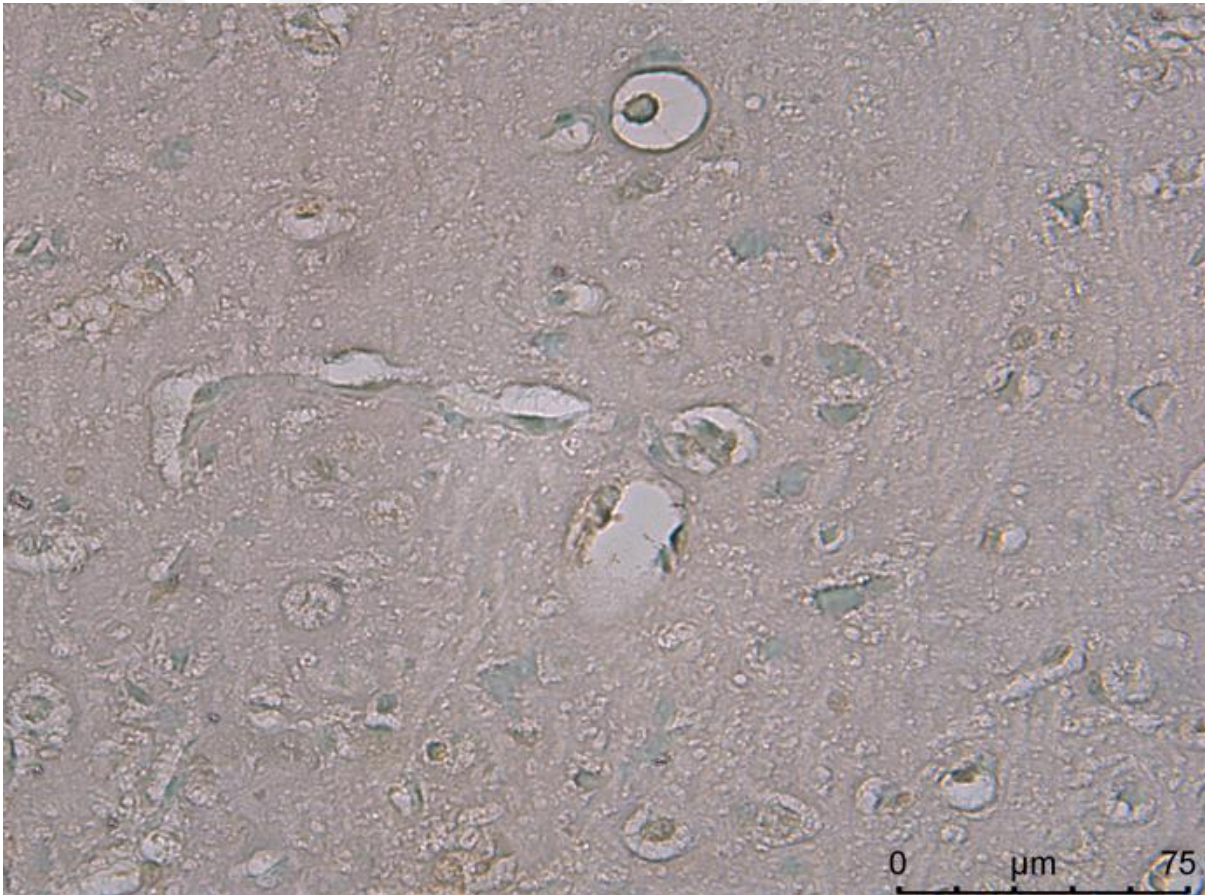


Şekil 14 : Kontrol grubuna ait histopatolojik inceleme: preparatta mavi görünenler

4.1.2 Tiyopental Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme

Tiyopental grubundaki hayvan beyinleri 5 bölüme ayrılarak incelendi. Bu gruptaki hayvanların nöron sayımı sırasından 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 0,83 olarak gelmiştir. Bu gruptaki hayvanların 1. Bölgede 4 hayvanda apoptotik hücre sayılmıştır. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 1,16 iken 4 hayvanda apoptotik hücelere rastlanmıştır. 3.bölgede ortalama 0.5 olarak gelirken 3 hayvanda apoptotik hücre izlenmiştir. 4. Bölgede ortalama 0,33 bulunurken 2 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. 5. Bölgede ortalama 0,66 ve 4 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. Bu sonuçlara baktığımız zaman sadece angiografi yapılan sonuçlarla arasında belirgin fark olmadığı görülmüştür. Tiyopentalin ek olarak nöronal apoptoza tek başına bir katkısının olmadığı görülmüştür.

Aynı grubun glial hücreler içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımızda 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 2,33 olarak gelmiştir. Bu gruptaki hayvanlarda 1. Bölgede 6 hayvanda apoptotik hücre sayılmıştır. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 1,5 iken 5 hayvanda apoptotik hücelere rastlanmıştır. 3.bölgede ortalama 2.16 olarak gelirken 6 hayvanda apoptotik hücre izlenmiştir. 4. Bölgede ortalama 1,66 bulunurken 6 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. 5. Bölgede ortalama 2 ve 5 hayvanda apoptotik hücre görülmüştür. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde sadece angiografi yapılan grup ile karşılaştırıldığında tiyopentalin glial hücre apoptozunu arttırmadığı görülmüştür.



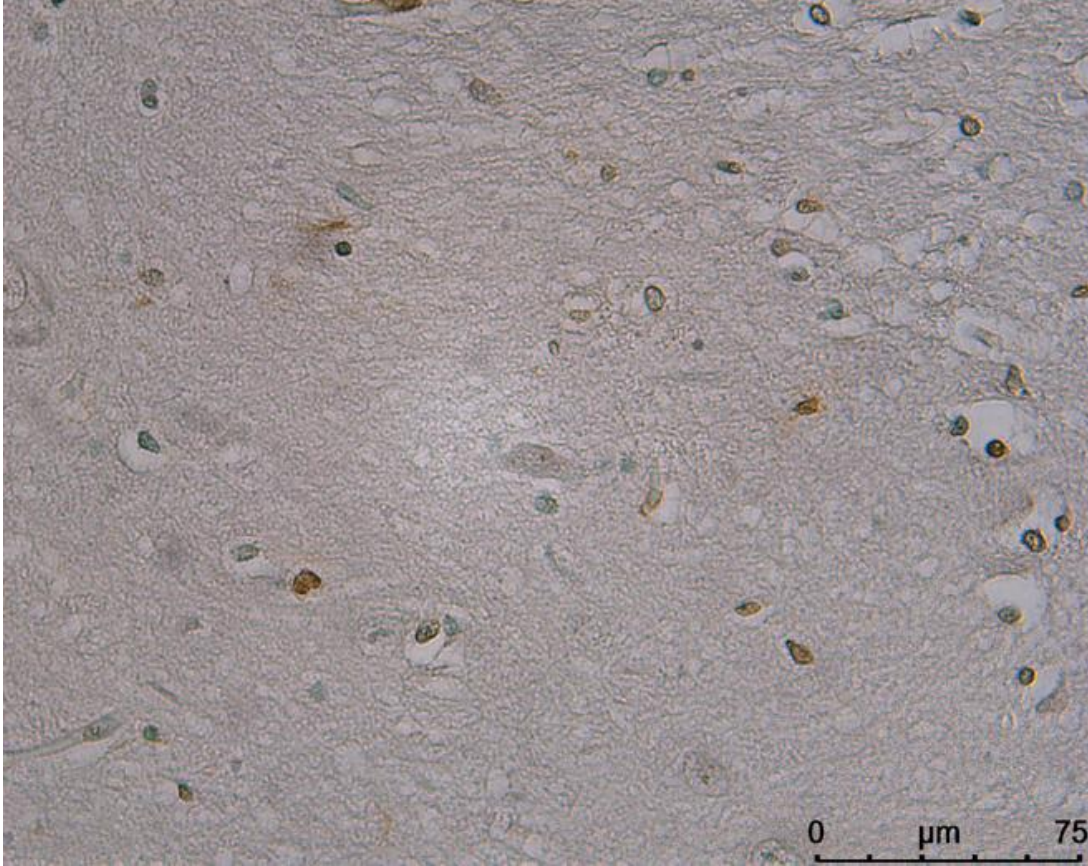
Şekil 15: Tiyopental grubuna ait histopatolojik inceleme

Kontrol grubu ve tiyopental beyin örneklerinin tümünde kortekste yer alan nöronların çoğu normal görünümlü olmakla birlikte, aralarında yer yer az sayıda kondanse görünümlü piknotik nöronlar vardı. Normal görünümlü nöronlar ökromatik çekirdekleri, belirgin çekirdekçikleri ile ayırt ediliyordu. Ön kısımlarda biraz daha fazla piknotik nöron varken arkaya doğru gidildikçe piknotik nöron sayısı azalıyordu. Korteks ve medullada kan damarlarında belirgin staz izlenmedi, bazı damar çevrelerinde minimal ödem vardı. Glia hücre morfolojileri de normal olarak izlendi.

4.1.3 İskemi Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme

İskemi grubundaki hayvan beyinleri 5 bölüme ayrılarak incelendi. Bu gruptaki hayvanların nöron sayımı sırasında 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 7,66 olarak gelmiştir.. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 5,66 bulunmuştur. 3.bölgede ortalama 5 olarak gelmiştir. 4. Bölgede ortalama 7,33 bulunurken 5. Bölgede ortalama 8,33 olarak görülmüştür. Bu sonuçlara baktığımız zaman nişasta partikülleri ile yapılan iskeminin başarılı olduğu görülmektedir.

Aynı grubun glial hücreler içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımızda 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 9,5 olarak gelmiştir.. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 8,83 bulunmuştur. 3.bölgede ortalama 10,5 olarak gelmiştir. 4. Bölgede ortalama 9,33 bulunurken 5. Bölgede ortalama 9,16 olarak görülmüştür. Bu sonuçları değerlendirdiğimizde nişasta mikroküreciklerinin glial hücreler üzerinde iskemi yarattığı gözlenmiştir.



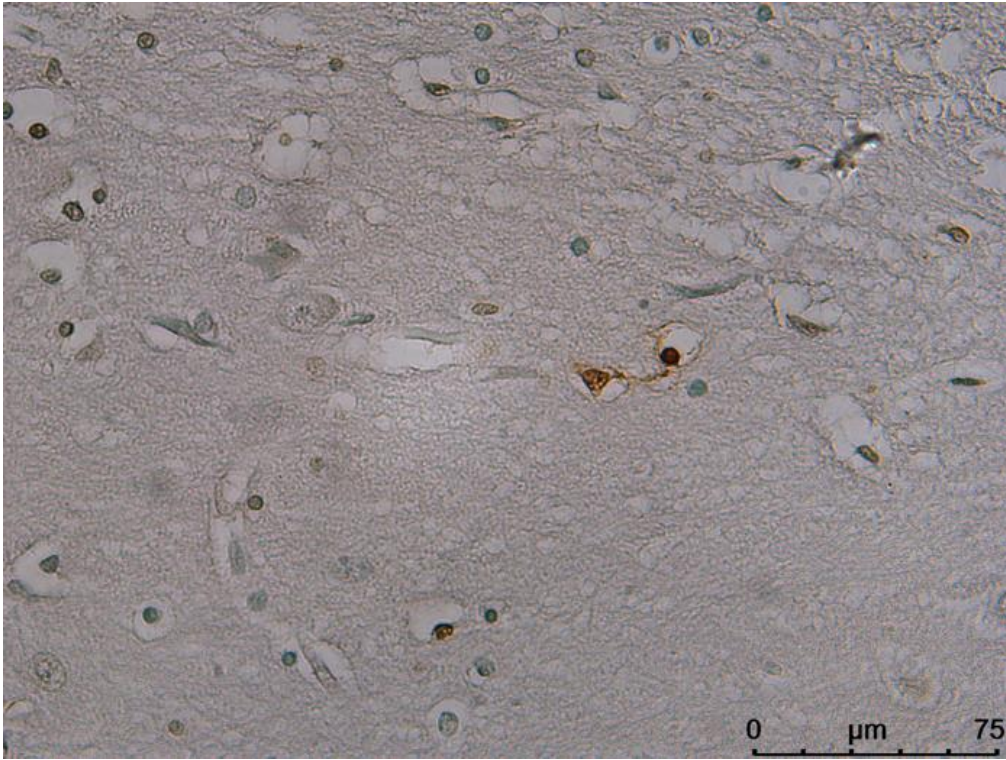
Şekil 16: İskemi grubuna ait histopatolojik inceleme

4.1.4 İskemi + tiyopental Grubuna Ait Histolojik Değerlendirme

İskemi + tiyopental grubundaki hayvan beyinleri 5 bölüme ayrılarak incelendi. Bu gruptaki hayvanların nöron sayımı sırasında 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 3,66 olarak gelmiştir.. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 2 bulunmuştur. 3.bölgede ortalama 3 olarak gelmiştir. 4. Bölgede ortalama 2,83 bulunurken 5. Bölgede ortalama 1,33 olarak görülmüştür. Bu sonuçlara baktığımız zaman nişasta partikülleri ile yapılan iskeminin başarılı olduğu görülmekle birlikte sadece iskemi grubuyla

karşılaştırıldığında tiyopentalin apoptotik hücre sayısına olumlu etkisinin olduğu gözlenmektedir.

Aynı grubun glial hücreler içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımızda 1. Bölgede yaklaşık apoptotik hücre sayımı ortalaması 4,83 olarak gelmiştir.. 2.bölgede apoptotik hücre ortalaması 5,5 bulunmuştur. 3.bölgede ortalama 3,5 olarak gelmiştir. 4. Bölgede ortalama 4,33 bulunurken 5. Bölgede ortalama 5,16 olarak görülmüştür. Bu sonuçları sadece iskemi grubu ile karşılaştırdığımızda tiyopentalin glial hücreler üzerindeki koruyucu etkisi gözlenmektedir.



Şekil 17: İskemi + tiyopental grubuna ait histopatolojik inceleme

Çalışmanın içerdiği gruplarda apoptozla ilişkili tek ve çift zincir immünreaktivitesi denek serebral kortekslerindeki nöron ve glialarda değerlendirildi. Apoptotik hücreler, ortalama apoptotik hücre yüzdesi olarak hesaplandı (pozitif işaretli apoptotik hücre sayısı / Toplam hücre sayısı x 100 %) ve apoptoz yaygınlığı hesaplanma için kullanıldı. Apoptotik nöron ve glia hücreleri iskemi hasarına uygun şekilde damar çevresine yakın bölgelerde izlendi. Çekirdeklerinde kromatin dağılımı marjinal yerleşimliydi.

Test	Clinical Criteria	Score	Potential Score
Behavior	Neck Twist	0-normal, 1-twist of the neck	1
Reflex	Righting Reflex	0-right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2
Stimuli Reflex	Extension Reflex (fore-paws) ^a	0-right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2
Stimuli Reflex	Extension Reflex (hind-paws) ^a	0- right in 1 sec, 1-right in 5 sec, 2-not right in 5 sec	2
Posture	Posture	0-normal resistance to contralateral push, 1-reduced resistance to lateral push, 2-falls down on contralateral side	2
	Death	Maximum Score with death	10
Total Cumulative Score Possible			10

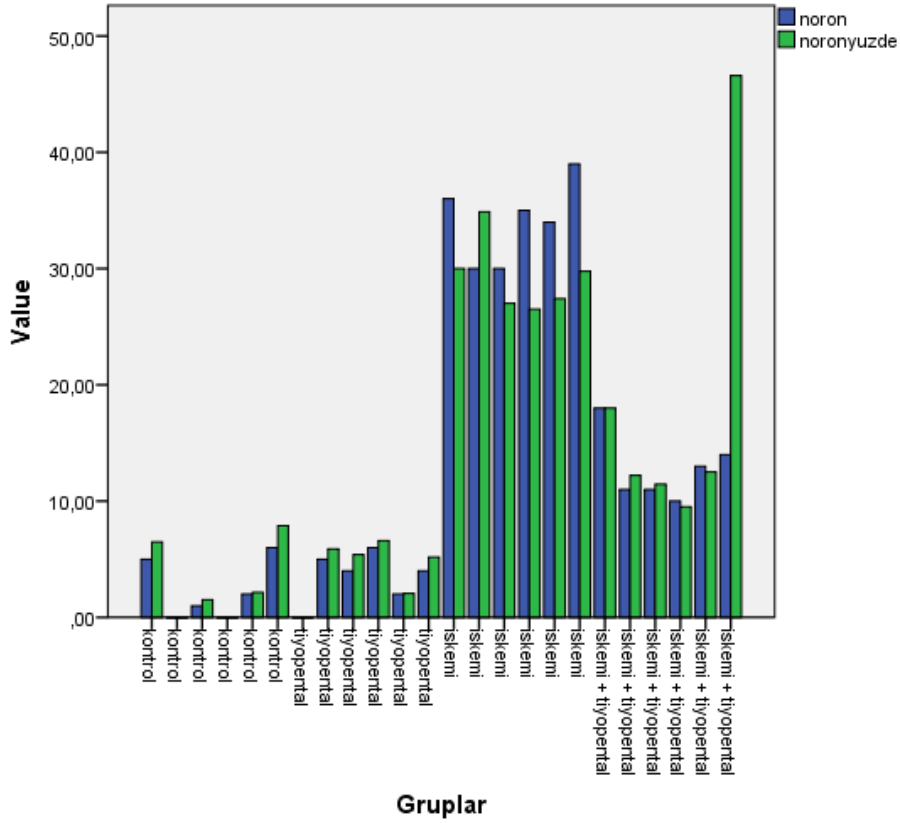
Şekil 18: Nörolojik inme skorlama sistemi(tavşan)

Nörolojik skorlama sistemine bakıldığında ise sadece tiyopental ve kontrol grubunda herhangi bir nörolojik defisit olmadan tam iyileşme sağlandığı görülmektedir. İskemi grubuna bakıldığında 3 hayvanın tamamen hemiplejik olduğu 2 hayvanın ileri derecede hemiparetik olduğu 1 hayvanın ise sekelsiz iyileştiği gözlenmiştir. Bu gruptaki ortalama NAS skoru 6,8 bulunmuştur. İskemi + tiyopental grubuna baktığımızda ise 1 hayvanın hemiplejik olduğu, 4 hayvanın hemiparetik olduğu ve 2 hayvanın ise tam iyileşme gösterdiği görülmektedir. Bu gruptaki hayvanların ortalama NAS skoru 5,3 olarak bulunmuştur. Her iki grup karşılaştırıldığı zaman tiyopental verilen iskemi grubunda skorların belirgin daha iyi olduğu ve nörolojik iyileşmenin daha fazla olduğu görülmüştür.

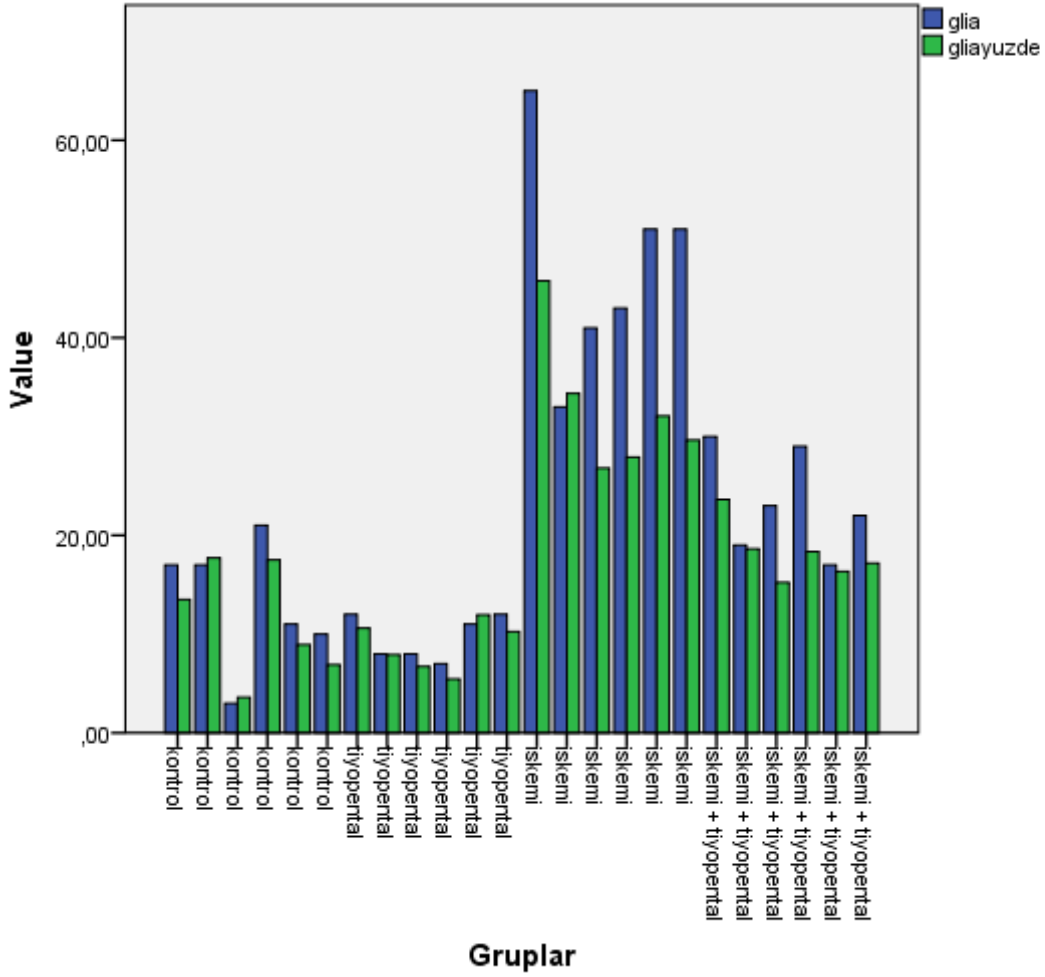
5. İSTATİSTİK

Kontrol grubu değerlendirildiğinde nöronal apoptoz sayısının 0 ile 6 arasında değiştiği gözlenmektedir. Bu grubun ortalaması 2,33 apoptotik hücre olarak bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranının ortalaması 3% olarak bulunmuştur. Glial hücrelerin

içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımız zaman ise oranlar 3 ile 21 arasından değişmekte ortalaması 13.1 bulunurken apoptotik glial hücrelerin normal glia hücrelerine oranı ise 11,3% olarak bulunmuştur. Bu sonuç ile birlikte glial hücrelerin iskemiye daha yatkın olduğu söylenebilir.



Şekil 19 : Nöron apoptotik hücre ile Nöron apoptotik hücrelerin normal nöronlara oranını gösteren tablo



Şekil 20 : Glia apoptotik hücre ile glial apoptotik hücrelerin normal nöronlara oranını gösteren tablo

Tiyopental grubu değerlendirildiğinde nöronal apoptoz sayısının 0 ile 6 arasında değiştiği gözlenmektedir. Bu grubun ortalaması 3,5 apoptotik hücre olarak bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranının ortalaması 4,1% olarak bulunmuştur. Glial hücrelerin içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımız zaman ise oranlar 7 ile 12 arasında değişmekte iken ortalaması 9,6 bulunurken apoptotik glial hücrelerin normal glia hücrelerine oranı ise 8,8% olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile hem nöronal apoptotik hücre hem de glia hücre apoptoz sayısı karşılaştırıldığında sayısal olarak tiyopental grubunda sayısal olarak daha az apoptotik hücre olsa da oranlama yapıldıktan sonra anlamlı sonuç görülmemektedir. (nöronal hücrelerde $p=0,4$ glia hücreleri arasında $p=0,2$). Bu açıdan değerlendirildiğinde kontrol grubu ile sadece tiyopental verilen grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır.

Test Statistics^a

	noron	noron yuzde	glia	glia yuzde
Mann-Whitney U	13,500	15,000	11,500	13,000
Wilcoxon W	34,500	36,000	32,500	34,000
Z	-,731	-,484	1,048	-,801
Asymp. Sig. (2-tailed)	,465	,629	,295	,423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,485 ^b	,699 ^b	,310 ^b	,485 ^b

Şekil 21: Tiypental verilen gruba kontrol grubu arasındaki istatistiksel ilişkiyi gösteren tablo. Bu tabloya bakıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamaktadır.

İskemi grubu değerlendirildiğinde nöronal apoptoz sayısının 30 ile 39 arasında değiştiği gözlenmektedir. Bu grubun ortalaması 34 apoptotik hücre olarak bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranının ortalaması 29,2% olarak bulunmuştur. Glial hücrelerin içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımız zaman ise 33 ile 65 arasında

değişmekte iken ortalaması 47,3 bulunurken apoptotik glial hücrelerin normal glia hücrelerine oranı ise 32,7% olarak bulunmuştur. Bu sonuç ile birlikte yapılan geçici iskeminin başarılı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sayısal olarak kontrol grubu ile arasında olan fark gözlenmektedir. İstatistiksel olarak baktığımızda $P < 0,001$ olarak bulunmuş olup iskemi açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tiyopental grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak güçlü anlamlılık sonucu çıkmaktadır.

Test Statistics^a

	nor on	noron yuzde	glia glia	glia yuzde
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,0 00	21,000	21,0 00	21,0 00
Z	- 2,892	-2,887	- 2,892	- 2,882
Asymp. Sig. (2- tailed)	,004	,004	,004	,004
Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,002 b	,002 ^b	,002 b	,002 b

Şekil 22: İskemi yapılan gruba kontrol grubu arasındaki istatistiksel ilişkiyi gösteren tablo. Bu tabloya bakıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaktadır bu da iskeminin başarılı olduğunun göstergesidir.

İskemi + tiyopental grubu değerlendirildiğinde nöronal apoptoz sayısının 11 ile 18 arasında değiştiği gözlenmektedir. Bu grubun ortalaması 22,83 apoptotik hücre olarak bulunmuştur. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranının ortalaması 18,38% olarak bulunmuştur. Glial hücrelerin içerisindeki apoptoz oranlarına baktığımız zaman ise 17 ile 30 arasından değişmekte iken ortalaması 23.3 bulunurken apoptotik glial hücrelerin normal glia hücrelerine oranı ise 18,2% olarak bulunmuştur. Bu sonuç iskemi grubuyla birlikte değerlendirildiğinde sayısal olarak apoptotik hücrelerdeki fark göze çarpmaktadır. Bu açıdan tiyopentalin hem normal hücrelere olan oranı hem de apoptotik hücre sayısını düşürdüğü gözlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde nöron apoptotik hücre sayısından , glial hücre apoptoz sayısı ve normal hücrelere oranında $p < 0,001$ olarak bulunarak istatistiksel olarak güçlü bir bağlantı bulunmuştur. Ancak nöron apoptoz hücre sayısının normal hücre sayısına oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$). Burdaki anlamlılık istatistiksel olarak intrakarotid uygulanan tiyopentalin koruyucu etkisini istatistiksel olarak ortaya koymaktadır. Bu grup kontrol grubu ve sadece tiyopental verilen grup ile karşılaştırıldığında sayısal olarak apoptotik hücre daha çok görülmektedir. İskemi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak güçlü bir korelasyon bulunmaktadır.

Test Statistics^a

	nor on	noron yuzde	glia	glia yuzde
Mann-Whitney U	,000	6,000	,000	,000
Wilcoxon W	21,0 00	27,000	21,0 00	21,0 00
Z	- 2,892	-1,922	- 2,887	- 2,882
Asymp. Sig. (2- tailed)	,004	,055	,004	,004
Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]	,002 b	,065 ^b	,002 b	,002 b

Şekil 23: İskemi yapılan grupta iskemi ve tiyopental verilen grup arasındaki istatistiksel ilişkiyi gösteren tablo. Bu tabloya bakıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaktadır. Bu da tiyopentalin intrakaratid olarak verilmesinin nöron ve glia koruyucu etkisinin istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu göstermektedir.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada selektif trans-arteryal mikrokaterizasyon yöntemi ile parçalanabilir nişasta mikroküreciklerini (PNM) kullanarak geçici bir serebral iskemi oluşturulabildiği ve intraarteriyel tiyopental uygulanarak tiyopentalin iskemi süresi ve iskemi üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiştir. İskemi oluşturulan hayvanların daha sonrasında yapılan nörolojik muayenelerinde düzelme olması bu iskeminin geçici olduğunu göstermektedir. İntraserebral angiografi yapılabilmesi açısından yeni bir metod denenerek serebral angiografinin daha az invaziv bir yoldan santral kulak arterinden yapılabilirdiği gösterilmiştir.

Tiyopentalin serebral iskemi sürecine etkisi bir çok çalışma tarafından yapılmış olsa da beyin süpresyonu oluşturacak doz miktarı çok yüksek olduğundan dolayı bu uygulamadan vazgeçilmiştir.[122] İntraarteriyel tiyopental uygulaması ile literatürde bir çok çalışma bulunmasına rağmen intraarteriyel olarak verilen tiyopentalin iskemi üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. İntrakarotid olarak verilen tiyopental ile ilgili 2 çalışma bulunmasına rağmen, bu çalışmalarda iskemi ile ilgili bir veri bulunmamaktadır.[138-140] Bu çalışmalarda daha çok tiyopentalin yan etkileri ve serebral burst supresyon üzerine etkileri araştırılmıştır.[138]

Şimdiye kadar literatürde beyinde iskemi oluşturmak için PNM'nin kullanıldığı yalnızca iki deneysel çalışma yayınlanmıştır[9, 10] . Öte yandan tiyopentalin serebral koruyucu etkisi ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır.[12, 131] .1981 yılında Winding ve arkadaşlarının, bizim çalışmamızda kullandığımız PNM'den ağısı yapısındaki değişiklikler ile ayrılan bir nişasta mikropartikül çeşidi olan Spherex ile yaptığı çalışmada serebral embolizasyonun klinik etkileri araştırılmış, uygulanan partikül miktarının meydana gelen nörolojik bulgularla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir [10]. Bu çalışmaya ait herhangi bir histolojik veri paylaşımı olmamıştır. Laccourreye ve arkadaşlarının 1993 yılında yine Spherex ile yaptığı çalışma ise intraserebral arteriyel embolizasyonun klinik ve histopatolojik sonuçlarını analiz etmek için dizayn edilmiş prospektif bir ön çalışma niteliğindedir [9]. Bu çalışmada kullanılan materyalin hızlı bioparçalanıma sahip olmasına rağmen beyinde iskemiye bağlı kalıcı hasarlar bıraktığı tespit edilmiştir. Ayrıca ipsilateral hemisferde, gri-beyaz cevher bileşkesindeki bir mikroenfarktın histolojik olarak gösterilmesi dışında iskemiden etkilenmiş ve piknotik nöron halini almış hücre sayısı ve beyin ödem miktarı hakkında bilgi verilmemiş olmasının yanında beynin muhtelif bölgeleri

arasında herhangi bir kıyaslamaya gidilmemiş olması da çalışmanın objektifliği açısından bir eksiklik olarak göze çarpmaktadır.

Çalışmamızda Santral kulak arter kateterizasyonundaki en büyük sorunlardan birisi damarda oluşan vazospazm idi. Bu sorunu aşabilmek amacıyla hayvanlar işlem yapılmadan önce ısıtılarak kulak dorsumuna alkol haricen uygulanarak vazospazm problemi büyük oranda kontrol altına alınabilmiştir. Dozları EEG sonuçlarına göre belirlenerek verilen hayvanlarda bu dozlarda izoelektrik EEG sağlanırken hayvan kendi solunumuna bırakılmıştır. Hem kontrol grubu hem de tiyopental verilen grup anestezi sonrası tam sekelsiz olarak iyileşirken iskemi yapılan grubun 50%'sinde tam tıkanma ve hemipleji gözlenmiştir. Buna karşılık iskemi ve tiyopental grubunda sadece 1 hayvanda total hemipleji olduğu gösterilmiştir. Bu da nörolojik sonuçlar açısından intrakarotid olarak verilen tiyopentalin nöron ve glia koruyucu etkisini belirgin olarak göstermektedir.

PNM'li iskemi grubunda internal karotid artere transkateterizasyon yöntemi ile staz meydana getirene kadar parçalanabilir nişasta partikülü uyguladık. Tiyopental verilen gruplarda ise eş zamanlı EEG ile takip edilerek izoelektrik noktaya ulaşıncaya kadar tiyopental intrakarotid olarak verilmiştir. Çalışma sırasında tiyopental verilen gruplara ortalama olarak 12,3 mg tiyopental verilmiştir. Tiyopental sonrası denekler kendi solunumlarına bırakılmıştır. Tiyopentalin ilk enjeksiyonu sırasında solunum sayısında azalma ve solunumda derinleşme olsa da hayvanların saturasyonlarında ve kan gazlarında herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Ardından alınan beyin kesitlerinde yalnızca iskemi, reperfüzyon ve kontrol grupları arasında gross bir iskemik karşılaştırma yapmakla kalmadık, her bir grubu kendi içinde farklı beyin bölgeleri olarak histolojik incelemeye tabi tuttuk. Bu bağlamda iskemiden etkilenmiş, uzantılarını kaybedip büzüşmüş ve piknotik nöronlar haline gelmiş hücrelerin sayımını gerçekleştirerek gruplar ve bölgeler arası istatistiksel karşılaştırma sonuçları elde ettik. İskemi grubunda, kontrol grubuna kıyasla çok sayıda piknotik apoptotik hücre ve ödemli beyin alanları görülmüştür. Tiyopental ve iskeminin beraber uygulandığı grupta ise iskemi grubuna kıyasla iskemiden etkilenen alanların daha az olduğu gözlemlenmiştir. Serumdaki alfa-amilazın, PNM'yi 35 dakikada parçaladığı bilgisinden yola çıkacak olursak bu çalışmanın sonuçları ile yaklaşık olarak 30-45 dakikalık bir geçici iskemi sürecinde tiyopentalin bu süreyi daha da arttırabileceği gösterilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak intaarteriyel olarak uygulanan

tiyopentalin kalıcı beyin hasarını engelleyebileceği engelleyemiyorsa bile azaltılabileceği gösterilmiştir.

PNM ile oluşturduğumuz serebral iskemi modeli mevcut deneysel iskemi modelleri ile kıyaslandığında; bir veya birkaç arterin mekanik yolla ligasyonu veya emboli oluşturmak amacıyla arter lümeninin içine yabancı bir maddenin sokulması ile oluşturulan global ve fokal serebral iskemi modellerinde meydana gelen iskemik hasarın patofizyolojisinde trombotik süreçler etkilenmediği görülmektedir. Bazı serebral iskemi modellerinde denek cerrahi işlemle kraniyumdan pencere açılarak iskemiye maruz bırakılmaktadır. Bu modelde de işlem sırasında parankim hasarı ve kafa içi basınç artışı oluşmaktadır [107]. Resüsitasyonsuz kardiyak arrest modeli gibi başka bir iskemik modelde ise iskemi sonrası dolaşımın sağlanamaması en büyük dezavantajdır [107]. PNM kullanarak oluşturulan iskemik modelde deneğin kasık bölgesinden girilmekte, iskemi radyolojik veriler eşliğinde kan akımında staz meydana getirilerek anjiyografik olarak desteklenmektedir. Mikrovaskülatuar yatakta gerçek bir embolizasyon oluşturulabildiği için de trombotik süreçler iskemi patofizyolojisine katılmakta ve denekler büyük cerrahi strese maruz kalmamaktadır.

Temel olarak geçici serebral iskemi modeli oluşturup iskeminin etkilerinin kalıcı olmasını başka bir ajan tarafından önlemeye çalıştığımız bu çalışmada, belli bir hacimde enfarkt oluşturabilmek için gerekli PNM miktarı henüz standardize edilebilmiş değildir. Hangi doz ile ne büyüklükte bir enfarkt oluşturulduğunun net olarak bilinmemesi çalışmanın bir eksikliği olup bu sorunun cevap bulabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda; bu çalışmanın literatürde henüz araştırılmamış intraarteriyel tiyopentalin iskemi üzerinde etkileri konusunda bazı bilgileri aydınlattığı söylenebilir. İntraarteriyel olarak uygulanan tiyopentalin yan etkilerinin gözlenmemesi ve normal dozundan çok daha düşük dozlarda serebral etkinin gözlenmesi de önemli bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Aynı zamanda daha ileri çalışmalarla birlikte intraarteriyel tiyopentalin eş zamanlı olarak akut inme geçiren hastalarda trombolitik tedavi ile standart bir tedavi olabilmesi açısından ilk çalışmalardan birisidir. Tabiki de ileri ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. İntrakarotid tiyopental uygulaması akut inme geçiren hastaların morbidite

ve mortalitesi üzerine yarar sağlayabilecek potansiyele sahip bir tedavi olarak görülmektedir.

Çalışmamızın en önemli kısıtlamalarından birisi EEG burst supresyonuna bir defa ulaşıldıktan sonra denekten deneğe farklı süreler devam etmesidir. Bu durumun deneklerde iskemi farklılığına sebep olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak literatürdeki çalışmalar burst supresyonun nöronlar üzerine koruyucu etkisinin olduğunu bildirmektedir. Bu konuyla da ilgili ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7. SONUÇ

Selektif trans-arteryal mikrokaterizasyon yöntemi ile parçalanabilir nişasta mikrokürecikleri kullanılarak serebral iskemi modeli oluşturup, intrakarotid tiyopental uygulamasının bu modeldeki etkilerini araştırdığımız bu çalışmada tiyopentalin hem glial hücreler hem de nöronlar üzerine koruyucu etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuca ulaşmamızda bize katkı sağlayan en önemli veri ise iskemi ve tiyopentalin birlikte uygulandığı deneklerden elde edilen beyin kesitlerindeki iskemik değişikliklerin sadece iskemi uygulanan gruba göre belirgin derecede az olmasıdır. Serebral ödemde meydana gelen azalma da bu veriyi destekler niteliktedir.

Bu çalışma, literatürde beyin dokusunda parçalanabilir nişasta mikrokürecikleri kullanımının olduğu çok az sayıda çalışma olması ve intrakarotid tiyopental uygulamasının iskemi üzerine etkilerini araştıran ilk çalışma olması açısından örnek teşkil etmektedir. Ancak son hedef olan akut iskemik inme hastalarında kullanılmasını mümkün kılacak sonuçlara ulaşmak amacıyla daha büyük deney gruplarında standardize edilmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Atyabi, F., et al., *Cross-linked starch microspheres: Effect of cross-linking condition on the microsphere characteristics*. Archives of pharmacal research, 2006. **29**(12): p. 1179-1186.
2. Pieper, C.C., et al., *Temporary arterial embolization of liver parenchyma with degradable starch microspheres (EmboCept® S) in a swine model*. Cardiovascular and interventional radiology, 2015. **38**(2): p. 435-441.
3. Fung, L.K. and W.M. Saltzman, *Polymeric implants for cancer chemotherapy*. Advanced drug delivery reviews, 1997. **26**(2-3): p. 209-230.
4. WHO, *Stroke 1989. Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy. Report of the WHO Task Force on stroke and other cerebrovascular disorders*, in *Stroke*. 1989. p. 1407-1431.
5. Jauch, E.C., et al., *Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association*. Stroke, 2013. **44**(3): p. 870-947.
6. Back, T., *Pathophysiology of the ischemic penumbra—revision of a concept*. Cellular and molecular neurobiology, 1998. **18**(6): p. 621-638.
7. Furlan, A., et al., *Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial*. Jama, 1999. **282**(21): p. 2003-2011.
8. Jahan, R., et al., *Intraarterial Thrombolysis for Treatment of Acute Stroke: Experience in 26 Patients with Long-Term Follow-up*. American Journal of Neuroradiology, 1999. **20**(7): p. 1291-1299.
9. Laccourreye, O., et al., *Biodegradable starch microspheres for cerebral arterial embolization*. Investigative radiology, 1993. **28**(2): p. 150-154.
10. Winding, O., *Cerebral microembolization following carotid injection of dextran microspheres in rabbits*. Neuroradiology, 1981. **21**(3): p. 123-126.
11. Smith, A.L., et al., *Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia*. Stroke, 1974. **5**(1): p. 1-7.
12. Frawley, J.E., et al., *Thiopental sodium cerebral protection during carotid endarterectomy: perioperative disease and death*. J Vasc Surg, 1994. **19**(4): p. 732-8.

13. Hoffman, W.E., et al., *Thiopental and desflurane treatment for brain protection*. Neurosurgery, 1998. **43**(5): p. 1050-3.
14. Zhan, R.Z., et al., *Thiopental inhibits increases in $[Ca^{2+}]_i$ induced by membrane depolarization, NMDA receptor activation, and ischemia in rat hippocampal and cortical slices*. Anesthesiology, 1998. **89**(2): p. 456-66.
15. Zarchin, N., et al., *Thiopental induced cerebral protection during ischemia in gerbils*. Brain Res, 1998. **780**(2): p. 230-6.
16. Hirotani, T., et al., *Protective effect of thiopental against cerebral ischemia during circulatory arrest*. Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **47**(4): p. 223-8.
17. Varathan, S., et al., *Hypothermia and thiopentone sodium: individual and combined neuroprotective effects on cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes*. Journal of neuroscience research, 2002. **68**(3): p. 352-362.
18. Turner, B.K., et al., *Neuroprotective effects of thiopental, propofol, and etomidate*. Aana j, 2005. **73**(4): p. 297-302.
19. Schalen, W., K. Messeter, and C.H. Nordström, *Complications and side effects during thiopentone therapy in patients with severe head injuries*. Acta anaesthesiologica scandinavica, 1992. **36**(4): p. 369-377.
20. Djindjian, R., et al., *Embolization by superselective arteriography from the femoral route in neuroradiology review of 60 cases*. Neuroradiology, 1973. **6**(1): p. 20-26.
21. Seldinger, S.I., *Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography: a new technique*. Acta radiologica, 1953(5): p. 368-376.
22. Payne, M.M., *Charles Theodore Dotter: the father of intervention*. Texas Heart Institute Journal, 2001. **28**(1): p. 28.
23. Lubarsky, M., C.E. Ray, and B. Funaki. *Embolization agents—which one should be used when? Part 1: large-vessel embolization*. in *Seminars in interventional radiology*. 2009. © Thieme Medical Publishers.
24. Flowerdew, A., et al., *Prospective randomized controlled trial of hepatic arterial embolization or infusion chemotherapy with 5- fluorouracil and degradable starch microspheres for colorectal liver metastases*. British Journal of Surgery, 1990. **77**(7): p. 779-782.

25. Dakhil, S., et al., *Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres*. *Cancer*, 1982. **50**(4): p. 631-635.
26. Patt, Y.Z., et al., *Percutaneous hepatic arterial infusion (HAI) of mitomycin C and floxuridine (FUDR): an effective treatment for metastatic colorectal carcinoma in the liver*. *Cancer*, 1980. **46**(2): p. 261-265.
27. Håkansson, L. and H. Starkhammar, *Degradable Starch Microspheres*. *Progress in Regional Cancer Therapy*, 2012: p. 89.
28. Thulin, L., et al., *Reduction of hepatic arterial flow by degradable microspheres in patients with liver tumor*. *Acta chirurgica scandinavica*, 1986. **152**: p. 447-451.
29. Lorelius, L.E., et al., *Enhanced drug retention in VX2 tumors by use of degradable starch microspheres*. *Investigative radiology*, 1984. **19**(3): p. 212-215.
30. Sigurdson, E.R., J.A. Ridge, and J.M. Daly, *Intra-arterial infusion of doxorubicin with degradable starch microspheres: Improvement of hepatic tumor drug uptake*. *Archives of Surgery*, 1986. **121**(11): p. 1277-1281.
31. Gyves, J.W., et al., *Improved regional selectivity of hepatic arterial mitomycin by starch microspheres*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1983. **34**(2): p. 259-265.
32. Teder, H. and C. Johansson, *The effect of different dosages of degradable starch microspheres (Spherex) on the distribution of doxorubicin regionally administered to the rat*. *Anticancer research*, 1993. **13**(6A): p. 2161-2164.
33. Starkhammar, H. and L. Harkansson, *Effect of starch microspheres on the passage of labelled erythrocytes and a low molecular weight marker through the liver*. *Acta Oncologica*, 1987. **26**(5): p. 361-365.
34. Yang, Y., et al., *Preparation, characterization and adsorption performance of a novel anionic starch microsphere*. *Molecules*, 2010. **15**(4): p. 2872-2885.
35. Hiraki, T., et al., *Radiofrequency ablation of normal lungs after pulmonary artery embolization with use of degradable starch microspheres: results in a porcine model*. *Journal of vascular and interventional radiology*, 2006. **17**(12): p. 1991-1998.

36. Van Es, R., et al., *Intra-arterial embolization of head-and-neck cancer with radioactive holmium-166 poly (L-lactic acid) microspheres: an experimental study in rabbits*. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2001. **30**(5): p. 407-413.
37. Kovács, A.F. and B. Turowski, *Chemoembolization of oral and oropharyngeal cancer using a high-dose cisplatin crystal suspension and degradable starch microspheres*. Oral oncology, 2002. **38**(1): p. 87-95.
38. Kirchhoff, T.D., et al., *Transarterial chemoembolization using degradable starch microspheres and iodized oil in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: evaluation of tumor response, toxicity, and survival*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007. **6**(3): p. 259-66.
39. Furuse, J., et al., *Pilot study of transcatheter arterial chemoembolization with degradable starch microspheres in patients with hepatocellular carcinoma*. American journal of clinical oncology, 2003. **26**(2): p. 159-164.
40. Bichler, K.-H. and S. Halim, *Therapy of bladder cancer*. International urology and nephrology, 1987. **19**(4): p. 399-413.
41. Tellez, C., et al., *Phase II trial of chemoembolization for the treatment of metastatic colorectal carcinoma to the liver and review of the literature*. Cancer, 1998. **82**(7): p. 1250-1259.
42. Takahashi, H., et al., *Malignant islet cell tumor of the pancreas with multiple liver metastases effectively treated by transcatheter arterial embolization with degradable starch microspheres--a case report*. Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy, 2000. **27**(12): p. 1936-1939.
43. Hong, K. and J.-F.H. Geschwind. *Locoregional intra-arterial therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma*. in *Seminars in oncology*. 2010. Elsevier.
44. İhsan Ökten, A. and A. Güzel, *Beynin Arteriyel Anatomisi*. 2012.
45. Kağan, T., et al., *SEREBRAL METABOLİZMA*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2001. **54**(01).
46. Demirkaya, Ş., *Vural O. Serebral kan akımı ve serebral metabolizma*. İç: Balkan S. Serebrovasküler Hastalıklar, 2002. **2**: p. 15-27.

47. Kandel, E.R., et al., *Principles of neural science*. Vol. 4. 2000: McGraw-hill New York.
48. Mehta, S.L., N. Manhas, and R. Raghbir, *Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics*. *Brain Res Rev*, 2007. **54**(1): p. 34-66.
49. Cimarosti, H. and J.M. Henley, *Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation*. *The Neuroscientist*, 2008. **14**(6): p. 626-636.
50. Mehta, S.L., N. Manhas, and R. Raghbir, *Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics*. *Brain research reviews*, 2007. **54**(1): p. 34-66.
51. Wintermark, M., et al., *Perfusion-CT assessment of infarct core and penumbra: receiver operating characteristic curve analysis in 130 patients suspected of acute hemispheric stroke*. *Stroke*, 2006. **37**(4): p. 979-985.
52. Astrup, J., B.K. Siesjö, and L. Symon, *Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra*. *Stroke*, 1981. **12**(6): p. 723-725.
53. Baron, J.-C., *Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment*. *Cerebrovascular diseases*, 1999. **9**(4): p. 193-201.
54. Lo, E.H., *A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke*. *Nature medicine*, 2008. **14**(5): p. 497.
55. Hossmann, K.-A., *Experimental models for the investigation of brain ischemia*. *Cardiovascular Research*, 1998. **39**(1): p. 106-120.
56. Budd, S.L., *Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation*. *Pharmacology & therapeutics*, 1998. **80**(2): p. 203-229.
57. Budd, S.L. and S.A. Lipton, *Calcium tsunamis: do astrocytes transmit cell death messages via gap junctions during ischemia?* *Nature neuroscience*, 1998. **1**(6): p. 431.
58. Giffard, R.G. and R.A. Swanson, *Ischemia- induced programmed cell death in astrocytes*. *Glia*, 2005. **50**(4): p. 299-306.

59. Mori, T., et al., *Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506*. *Neurochemistry international*, 2004. **45**(2-3): p. 381-387.
60. Ohta, K., et al., *Calcium ion transients in peri-infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats*. *Stroke*, 2001. **32**(2): p. 535-543.
61. Mies, G., T. Iijima, and K. Hossmann, *Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat*. *Neuroreport*, 1993. **4**(6): p. 709-711.
62. Umegaki, M., et al., *Peri-infarct depolarizations reveal penumbra-like conditions in striatum*. *Journal of Neuroscience*, 2005. **25**(6): p. 1387-1394.
63. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and $\alpha 1$ -syntrophin mediated by PDZ domains*. *Cell*, 1996. **84**(5): p. 757-767.
64. Kuroda, S., et al., *The calmodulin antagonist trifluoperazine in transient focal brain ischemia in rats: anti-ischemic effect and therapeutic window*. *Stroke*, 1997. **28**(12): p. 2539-2544.
65. Erondy, N.E. and M.B. Kennedy, *Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain*. *Journal of Neuroscience*, 1985. **5**(12): p. 3270-3277.
66. Churn, S.B., et al., *Temperature modulation of ischemic neuronal death and inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in gerbils*. *Stroke*, 1990. **21**(12): p. 1715-1721.
67. Churn, S.B., et al., *Global Forebrain Ischemia Induces a Posttranslational Modification of Multifunctional Calcium- and Calmodulin- Dependent Kinase II*. *Journal of neurochemistry*, 1992. **59**(4): p. 1221-1232.
68. SÉe, V., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons*. *The FASEB Journal*, 2001. **15**(1): p. 134-144.
69. Nita, D.A., et al., *Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion- a biochemical study in rat*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2001. **5**(2): p. 163-170.

70. Chan, P.H., *Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2001. **21**(1): p. 2-14.
71. Beetsch, J.W., et al., *Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells*. Brain research, 1998. **786**(1-2): p. 89-95.
72. Katsuki, H. and S. Okuda, *Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance*. Progress in neurobiology, 1995. **46**(6): p. 607-636.
73. Namura, S., et al., *Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(20): p. 11569-11574.
74. Huang, J., et al., *Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein*. Science, 1999. **285**(5427): p. 595-599.
75. Nozaki, K., M. Nishimura, and N. Hashimoto, *Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia*. Molecular neurobiology, 2001. **23**(1): p. 1-19.
76. Lennmyr, F., et al., *Activation of mitogen- activated protein kinases in experimental cerebral ischemia*. Acta neurologica scandinavica, 2002. **106**(6): p. 333-340.
77. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(2): p. 173-185.
78. Yurchenco, P.D. and J.C. Schittny, *Molecular architecture of basement membranes*. The FASEB Journal, 1990. **4**(6): p. 1577-1590.
79. Mark, K.S. and T.P. Davis, *Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **282**(4): p. H1485-H1494.
80. Gidday, J.M., et al., *Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2005. **289**(2): p. H558-H568.
81. Fukuda, S., et al., *Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix*. Stroke, 2004. **35**(4): p. 998-1004.

82. Machado, L.S., et al., *Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke*. BMC neuroscience, 2006. **7**(1): p. 56.
83. Del Zoppo, G.J., *Stroke and neurovascular protection*. n engl j med, 2006. **354**(6): p. 553-555.
84. Okada, Y., et al., *P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion*. Stroke, 1994. **25**(1): p. 202-211.
85. Morikawa, E., et al., *Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin*. Stroke, 1996. **27**(5): p. 951-956.
86. Lindsberg, P.J., et al., *Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 939-945.
87. Del Zoppo, G.J., et al., *Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons*. Stroke, 1991. **22**(10): p. 1276-1283.
88. Liu, T., et al., *Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex*. Stroke, 1993. **24**(11): p. 1746-1750.
89. Huang, J., U.M. Upadhyay, and R.J. Tamargo, *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. Surgical neurology, 2006. **66**(3): p. 232-245.
90. Yamasaki, Y., et al., *Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats*. Stroke, 1995. **26**(4): p. 676-681.
91. Relton, J., et al., *Peripheral administration of interleukin-1 receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat*. Experimental neurology, 1996. **138**(2): p. 206-213.
92. Wang, X., et al., *Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1995. **15**(1): p. 166-171.
93. Zaremba, J. and J. Losy, *Early TNF- α levels correlate with ischaemic stroke severity*. Acta Neurologica Scandinavica, 2001. **104**(5): p. 288-295.
94. Dringen, R., B. Pfeiffer, and B. Hamprecht, *Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(2): p. 562-569.

95. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Progress in neurobiology, 2000. **62**(6): p. 649-671.
96. Anderson, M.F., et al., *Astrocytes and stroke: networking for survival?* Neurochemical research, 2003. **28**(2): p. 293-305.
97. Thoren, A.E., et al., *Astrocytic function assessed from 1-14C-acetate metabolism after temporary focal cerebral ischemia in rats*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005. **25**(4): p. 440-450.
98. Kimelberg, H.K., *Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy*. Glia, 2005. **50**(4): p. 389-397.
99. Linnik, M.D., R.H. Zobrist, and M.D. Hatfield, *Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats*. Stroke, 1993. **24**(12): p. 2002-2008.
100. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *The central effectors of cell death in the immune system*. Annual review of immunology, 1999. **17**(1): p. 781-828.
101. Bicknell, G.R. and G.M. Cohen, *Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis*. Biochemical and biophysical research communications, 1995. **207**(1): p. 40-47.
102. Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey, *Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia*. Stroke, 2009. **40**(5): p. e331-e339.
103. Traystman, R.J., *Animal models of focal and global cerebral ischemia*. ILAR journal, 2003. **44**(2): p. 85-95.
104. Mhairi, M.I., *New models of focal cerebral ischaemia*. British journal of clinical pharmacology, 1992. **34**(4): p. 302-308.
105. Morishita, E., et al., *Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death*. Neuroscience, 1996. **76**(1): p. 105-116.
106. Ginsberg, M.D. and R. Busto, *Rodent models of cerebral ischemia*. Stroke, 1989. **20**(12): p. 1627-1642.
107. Molinari, G. and J. Laurent, *A classification of experimental models of brain ischemia*. Stroke, 1976. **7**(1): p. 14-17.

108. Smith, M.L., et al., *Models for studying long- term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2- vessel occlusion model.* Acta neurologica Scandinavica, 1984. **69**(6): p. 385-401.
109. Eklöf, B. and B.K. Siesjö, *Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation in the rat.* Acta Physiologica, 1973. **87**(1): p. 69-77.
110. Pulsinelli, W.A. and J.B. Brierley, *A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat.* Stroke, 1979. **10**(3): p. 267-272.
111. Ljunggren, B., H. Schutz, and B. Siesjo, *Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia.* Brain research, 1974. **73**(2): p. 277-289.
112. Yoshida, S., et al., *Regional brain energy metabolism after complete versus incomplete ischemia in the rat in the absence of severe lactic acidosis.* Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1985. **5**(4): p. 490-501.
113. Siemkowicz, E. and A.J. Hansen, *Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo- , normo- and hyperglycemic rats.* Acta Neurologica Scandinavica, 1978. **58**(1): p. 1-8.
114. Ikeda, M., et al., *Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia.* Journal of neurochemistry, 1986. **47**(1): p. 123-132.
115. Levine, S., *Anoxic-ischemic encephalopathy in rats.* The American journal of pathology, 1960. **36**(1): p. 1.
116. Coyle, P., *Different susceptibilities to cerebral infarction in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Sprague-Dawley rats.* Stroke, 1986. **17**(3): p. 520-525.
117. Gotoh, O., et al., *Nimodipine and the haemodynamic and histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat.* Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1986. **6**(3): p. 321-331.
118. Rosenblum, W.I. and F. El-Sabban, *Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents.* Circulation Research, 1977. **40**(3): p. 320-328.

119. Papadopoulos, S.M., et al., *Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke*. Journal of neurosurgery, 1987. **67**(3): p. 394-398.
120. Furlow, T.W. and N.H. Bass, *Stroke in rats produced by carotid injection of sodium arachidonate*. Science, 1975. **187**(4177): p. 658-660.
121. Scremin, O.U., R.R. Sonnenschein, and E.H. Rubinstein, *Cerebrovascular anatomy and blood flow measurements in the rabbit*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1982. **2**(1): p. 55-66.
122. Russo, H. and F. Bressolle, *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of thiopental*. Clinical pharmacokinetics, 1998. **35**(2): p. 95-134.
123. Mark, L.C., et al., *The passage of thiopental into brain*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1957. **119**(1): p. 35-38.
124. Stanski, D.R., et al., *Pharmacodynamic modeling of thiopental anesthesia*. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics, 1984. **12**(2): p. 223-240.
125. Price, H., J. Dundee, and E. Conker, *Rates of uptake and release of thiopental by human brain; relation to kinetics of thiopental anesthesia*. Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 1994. **18**(1): p. 171-171.
126. Pierce, E.C., et al., *Cerebral circulation and metabolism during thiopental anesthesia and hyperventilation in man*. The Journal of clinical investigation, 1962. **41**(8): p. 1664-1671.
127. Kassell, N.F., et al., *Alterations in cerebral blood flow, oxygen metabolism, and electrical activity produced by high dose sodium thiopental*. Neurosurgery, 1980. **7**(6): p. 593-597.
128. Lipton, S.A. and P.A. Rosenberg, *Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders*. New England Journal of Medicine, 1994. **330**(9): p. 613-622.
129. Majewska, M.D., J. Strozajder, and J. Łazarewicz, *Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids*. Brain research, 1978. **158**(2): p. 423-434.

130. Eriksson, K., et al., *Effects of long barbiturate anaesthesia on eight children with severe epilepsy*. *Neuropediatrics*, 1993. **24**(05): p. 281-285.
131. Michenfelder, J.D. and R.A. Theye, *Cerebral protection by thiopental during hypoxia*. *Anesthesiology*, 1973. **39**(5): p. 510-517.
132. Ward, J.D., et al., *Failure of prophylactic barbiturate coma in the treatment of severe head injury*. *Journal of neurosurgery*, 1985. **62**(3): p. 383-388.
133. Brodie, B.B., et al., *The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1950. **98**(1): p. 85-96.
134. Turcant, A., et al., *Thiopental pharmacokinetics under conditions of long-term infusion*. *Anesthesiology*, 1985. **63**(1): p. 50-54.
135. Cheng, M.A., M.A. Theard, and R. Tempelhoff, *Intravenous agents and intraoperative neuroprotection: beyond barbiturates*. *Critical care clinics*, 1997. **13**(1): p. 185-199.
136. Wada, J. and T. Rasmussen, *Intracarotid injection of sodium amytal for the lateralization of cerebral speech dominance: experimental and clinical observations*. *Journal of Neurosurgery*, 1960. **17**(2): p. 266-282.
137. Zaidat, O.O., et al., *Response to intra-arterial and combined intravenous and intra-arterial thrombolytic therapy in patients with distal internal carotid artery occlusion*. *Stroke*, 2002. **33**(7): p. 1821-1827.
138. Joshi, S., et al., *Comparison of intracarotid anesthetics for EEG silence*. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2006. **18**(2): p. 112-8.
139. Joshi, S., et al., *Reducing cerebral blood flow increases the duration of electroencephalographic silence by intracarotid thiopental*. *Anesth Analg*, 2005. **101**(3): p. 851-8, table of contents.
140. Joshi, S., et al., *Electrocerebral silence by intracarotid anesthetics does not affect early hyperemia after transient cerebral ischemia in rabbits*. *Anesth Analg*, 2004. **98**(5): p. 1454-9, table of contents.