

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE SEFTRİAKSON'UN ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Orbay BIYIK

TRABZON-2018

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE SEFTRİAKSON'UN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Orbay BIYIK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erhan ARSLAN

TRABZON-2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bana verdikleri desteklerinden ötürü Prof. Dr. Süleyman BAYKAL, Prof. Dr. Kayhan KUZEYLİ, Prof. Dr. Haydar USUL, Prof. Dr. Ertuđrul ÇAKIR, Doç. Dr. Erhan ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Uđur YAZAR ve Yrd. Doç. Dr. Ali Rıza GÜVERCİN hocalarıma, deney aşamasında vermiş olduğu destekten ötürü değerli mesai arkadaşlarıma, dua ve emeklerini üzerimden hiç eksik etmeyen babam, annem ve eşime destek ve sabırlarından dolayı teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Orbay BIYIK



ÖZET

Ratların Deneysel Beyin İskemi ve Reperfüzyon İnfürisinde Seftriakson'un Etkileri

Amaç: Geçici beyin iskemisi oluşturulan ratlardaki iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerine seftriakson'un hipokampal bölgede malondialdehid düzeylerine ve nörolojik muayene üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda 220–280 g ağırlığında olan 38 adet spraque dawley sıçanı deneye alındı. İki damar oklüzyon + hipotansiyon iskemi-reperfüzyon modeli uygulaması için, bilateral karotis arterler geçici olarak (30 dk) kliplenip intrakardiyak 3 cc kadar kan alındıktan sonra hipotansiyon yaratılmıştır. 30 dk sonunda klipler çıkarılıp reperfüzyon ortamı oluşturulmuştur. 12 sıçandan oluşan bir gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi + hipotansiyon (10ml/kg) yapıldıktan sonra her gün seftriakson 200 mg/kg/gün intraperitoneal verildi. 1., 4., 7. ve 10. günlerde nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 12 sıçandan oluşan diğer gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi+hipotansiyon (10ml/kg) oluşturularak sadece iskemi yapıldı (2016/54 nolu çalışma ile ortak grup). 1., 4., 7. ve 10. günlerde nörolojik muayeneleri yapıldı. 10. günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 7 rattan oluşan bir gruba sadece cilt laserasyonu yapıldı ve 200 mg/kg/gün intraperitoneal seftriakson verildi. 1., 4., 7. ve 10. günlerde nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 7 rattan oluşan son gruba sadece 15 dakika anestezi verildi. 1., 4., 7. ve 10. günlerde nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

Bulgular: Beyin dokusundaki MDA seviyesi kontrol grubu ve iskemi grubu ile kıyaslandığında doku MDA seviyesini önemli miktarda arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Pür kontrol ve seftriakson gruplarının MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0.05$), iskemi grubu ile kıyaslandığında seftriakson uygulamasının anlamlı şekilde doku MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Serum MDA seviyesi iskemi grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). İskemide uygulanan seftriaksonun serum MDA seviyesinde belirgin bir düşüş sağlayamadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Sonuç: Serebral iskemi ve reperfüzyon hasarlanmasında seftriaksonun serumda artan MDA'yı düşürmediği fakat serebral dokuda MDA'yı düşürerek nöroprotektif etkinliğinin olduğu çalışmamızda gösterildi.

Anahtar Kelimeler: iskemi, malondialdehid, seftriakson



SUMMARY

Effects of Ceftriaxon on Experimental Brain Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of ceftriaxone on malondialdehyd in hippocampal region and the neurologic findings at rats with artificially maintained transient brain ischemia.

Materials and Method: In our study, 38 spraque dawley rats weighing 220-280 g were tested. Two-vessel occlusion + hypotension for ischemia-reperfusion model application, bilateral carotid arteries were temporarily clipped (30 min) and 3 cc of blood was taken in to the intracardiac volume and hypotension was created. After 30 min, the clips were removed and a reperfusion medium was created. A group of 12 rats was done 30 min bilateral carotid artery clipping + hypotension (10 ml / kg) and after there was given intraperitoneal ceftriaxone 200 mg / kg / day dose every day. On the 1st, 4th, 7th and 10th days, neurological examinations were performed. At the end of the ten day, the rats was sacrificed and the brain tissue was removed. Other group consisting of 12 rats was done only 30 min bilateral carotid artery clipping + hypotension (10 ml / kg) and only was done ischemia (joint experiment group with the study of 2016/54). On the 1st, 4th, 7th and 10th days, neurological examinations were performed. At the end of the ten day, the rats was sacrificed and the brain tissue was removed. Other group consisting of 7 rats was done only skin laceration and received intraperitoneal ceftriaxone at 200 mg / kg / day. On the 1st, 4th, 7th and 10th days, neurological examinations were performed. At the end of the ten day, the rats was sacrificed and the brain tissue was removed. The last group consisting of 7 rats was given only 15 minutes anesthesia. On the 1st, 4th, 7th and 10th days, neurological examinations were performed. At the end of the ten day, the rats was sacrificed and the brain tissue was removed.

Findings: It was determined that ischemia administration significantly increased brain MDA levels compared with brain tissue control group MDA level ($p < 0.05$). While there was no significant difference between MDA levels of sham and ceftriaxon groups ($p > 0.05$), it was determined that ceftriaxon application decreased significantly MDA level compared to ischemia group ($p < 0.05$). The MDA

level of the ischemia group was significantly increased compared to the control group serum MDA level ($p < 0.05$). While the difference between the control group and the sham group was not significant ($p > 0.05$), it was found that there was no significant decrease in ceftriaxone serum MDA level in ischemia ($p > 0.05$).

Results: In this study, statistically, it was determined that ceftriaxone has does not reduce level of MDA in the plasma, but the other hand statistically, it was determined that ceftriaxone has does reduce level of MDA in the brain tissue and it was showed neuroprotective effect.

Key Words: ceftriaxone, ischemia, malondialdehyd



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	6
2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi.....	9
2.3. Beyin Dokusu Histolojisi	14
2.3.1. Nöron	14
2.3.2. Glia hücreleri	16
2.4. Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik Ve Histolojik Özellikleri	18
2.5. İskemi Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi.....	19
2.6. Glutamat Eksitotoksitesitesi ve Kalsiyum Sitotoksitesitesi	21
2.7. Serbest Radikaller	24
2.8. Myeloperoksidaz	28
2.9. Lipid Peroksidasyonu Ve Myeloperoksidaz	28
2.10. Seftriakson.....	29
3. MATERYAL ve METOD.....	31
3.1. Deney Hayvanları.....	31
3.2. Gruplar	31
3.3. Metod	32
3.4. Malondialdehit Tayini	37
3.4.1. Dokuda Malondialdehit Tayini	37
3.4.2. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.4.3. Doku MDA Ölçümü	38

3.4.4. Plazmada Malondialdehit Tayini	39
3.4.5. Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	40
3.4.6. Serum MDA Ölçümü.....	40
3.5. Motor Muayene	41
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKLAR	50



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Serbest Radikal Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar.....	27
Tablo 2. Bederson Skalası	41
Tablo 3. Deneysel Beyin İskemi Reperfüzyon Yaralanmasında Takip Parametreleri.....	42
Tablo 4. Grupların Bederson Motor Skalasına Göre 1., 4., 7. ve 10. Günlerdeki Skorları	45
Tablo 5. Grupların Bederson Motor Skalasına Göre 1., 4., 7. ve 10. Günlerdeki Skorları Median ve Min-Max Değerleri.....	45



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	İskemi Yaralanmasındaki Zonlar.....	4
Şekil 2.	Serebral İskeminin Zamansal Görünümü	5
Şekil 3.	Willis Poligonu	10
Şekil 4.	Ratların Beyin Anatomisi	13
Şekil 5.	Ratların Beyin Arteriyel Anatomisi.....	14
Şekil 6.	NMDA Reseptör Aktivasyonu	20
Şekil 7.	Seftriaksonun Kimyasal Yapısı,	30
Şekil 8.	Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği.....	39
Şekil 9.	Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği	41
Şekil 10.	Doku MDA Ortalamaları.....	43
Şekil 11.	Serum MDA Ortalamaları	44

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Supine Pozisyonda Paratrakeal Alanların Disseksiyonu	32
Resim 2. Sol A.Karotis Communise Yaşargil Klibi Yerleştirilmesi	33
Resim 3. Bilateral A.Karotis Communise Yaşargil Anevrizma Klibi Yerleştirilmesi	33
Resim 4. Sütüre Edilmesi	34
Resim 5. Sıçanların Ayrı Ayrı Yerleştirilmesi.....	34
Resim 6. Sıçanlar Besin Ve Suya Ulaşabileceği Ayrı Ayrı Yaşam Alanları.....	35
Resim 7. Sakrifiye Edilen Ratların Beyin Dokusunun Çıkarılması.....	35
Resim 8. Beynin Hipokampus, C.Striatum, Corpus Kallozum ve Talamus Kısımlarının Ayrılması	36

1. GİRİŞ

İskemi, arteriyel veya venöz kan akımının azalmasına, tıkanmasına, damar dışına kanamalar nedeniyle dokunun oksijensiz kalması, hücre içi enerji depolarının bitmesi ve toksik metabolit oluşmasıyla hücre ölümüne gitmesidir (1). Reperfüzyona bağlı hasarda bir çok mekanizma ile birlikte esasen serbest oksijenin hücreye hızla girmesi ile oluşan serbest oksijen radikelleri (SOR) sorumludur ve hücrenel yapılardan; proteinler, deoksiribonükleik asitler, nükleik asitler, zar lipitleri ise duyarlılığı en yüksek olan yapılardır (2). Reperfüzyonda hasar iskemiye göre çok daha ciddidir (3). Serebral iskemi (inme), fokal veya global serebral perfüzyonun azalması veya kesilmesi halinde iskemi oluşumuna bağlı kalıcı ya da geçici nörolojik defisit oluşumu olarak tanımlanabilir (4, 5). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre inme; vasküler nedenler haricinde her hangi bir sebep yokken global veya fokal beyin fonksiyonuna yönelik belirtilerin ve bulguların hızla kaybı ile karakterize, mortalite ile sonuçlana bilen ya da işlev kaybının 24 saati geçebildiği klinik sendromdur (6). Serbral iskemi dünyada ki sakatlık ve ölümlerin en yaygın nedenlerinden biridir (7). İnme vakalarının %80-85'i iskemi kaynaklı, %15-20'si ise hemorajiye bağlı sebeplerden olup, akut stroke, koroner hastalıklar ve kanserden sonra mortalitenin en sık nedeni olmakla beraber yaşlılardaki epilepsinin, demansın ve depresyonun da sık nedenleri arasındadır. ABD'de yılda 795.000 yeni stroke vakası olmakta ve 40 saniyede bir kişi stroke geçirmekte ve 4 dakikada bir kişi bu sebepten kaybedilmektedir (8-12). Serebrovasküler iskemi ölüm ile sonuçlanmamış kişilerin hayat kalitesini ciddi biçimde etkileyen, günlük yaşamlarında bakıma muhtaç olmalarına sebep olan önemli bir patoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (13, 14).

Mortalite, morbidite, ekonomik ve psikososyal kayıpları nedeniyle çok sayıda çalışma ve deneysel modeli bulunan iskemik inmenin daha iyi anlaşılabilmesi, serbral hasarın geriye döndürülebilmesi, tedavi modellerinin oluşturulabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. İskeminin geriye döndürülmesine yönelik halen kabul görmüş net bir tedavi bulunmamaktadır.

İskemik bölgenin çevresindeki rezidüel kan akımı, nöronların kısa süreli morfolojik ve biyokimyasal bütünlüğünü koruyarak akut dönemde fonksiyonsuz

olmakla birlikte yapısal bütünlüklerini sürdüren, iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak enfarkta doğru ilerlediği dinamik süreç içerisindeki bölgelere penumbra denir. Bu süreç rezidüel kan akımınınıyla ilişkili dakikalardan saatlere kadar sürebilir. Penumbra, erken dönemde yeniden kan akımının sağlanması ve/veya nöroprotektif ajanların kullanılmasıyla kurtarılabilir (15). Bu kurtarılabilir doku günümüzdeki tedavi yaklaşımlarının hedefini oluşturmaktadır.

Fizyolojik, psikolojik ve sosyoekonomik olarak iskemiye gitmesi halinde ciddi sonuçları olan penumbranın kurtarılabilmesi için günümüzde; glutamat antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, dimetilsulfoksit, mannitol, steroidler, isoproterenol, beyin-omurluk sıvısı basıncının azaltılması, vitamin E ve C, tiroid relasing hormon, aminofilin, sodyum kanal blokerleri, hipotermi ve lokal soğutma gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (16).

Sıçanlarda bilateral arterie carotis communis kliplenerek serebral akımın azaltılması, tamamen kesilmesi fokal serebral iskeminin patofizyolojisini anlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (17). Kolay uygulanabilir olması ve kraniyektomi gerektirmemesi nedeniyle bu model kullanılması uygun görülmüştür.

H. influenzae, N. gonorrhoeae, meningokoklar ve pnömokoklara karşı etkili olan, plazma proteinlerine %90 oranında bağlanan, beyin-omurilik sıvısına iyi geçen, kısmen karaciğerde metabolize olup kısmen de böbrekten elimine olan, sefalosporinler arasında yarılanma ömrü en uzun olan üçüncü kuşak, kalsiyum bağlayıcı özelliklerinin yanı sıra, glutamat taşıyan protein düzeyinde artışa yol açarak glutamat toksisitesinden nöronları koruyarak nöroprotektif etkisi olan üçüncü kuşak bir sefalosporindir (18).

Çalışmalar göz önüne alınarak, sıçanlarda deneysel fokal beyin iskemisi yaratmak suretiyle, iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerine seftriakson'un nöroprotektif etkilerini araştırmayı hedefledik.

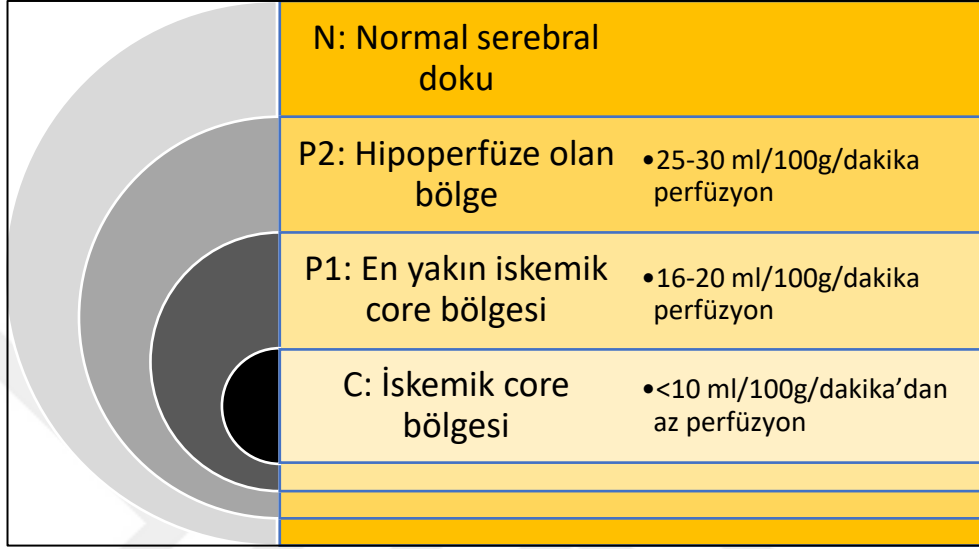
2. GENEL BİLGİLER

Tüm dünyada erişkinlikte meydana gelen morbidite ve mortalitenin en sık sebeplerinden biri iskemik beyin hastalıklarıdır (7). İnme vakalarının %80-85'i iskemi kaynaklı, %15-20'si ise hemorajiye bağlı sebeplerden olup, akut stroke, koroner hastalıklar ve kanserden sonra mortalitenin en sık nedeni olmakla beraber yaşlılardaki epilepsinin, demansın ve depresyonun da sık nedenleri arasındadır (8-12). Bu sebeple gelişen fonksiyon bozuklukları, hayat kalitesini ve sosyoekonomik durumu düşürmekte, tıbbi maliyetlerin de artışına neden olmaktadır (19). Serebral iskemi, beyne giden kan akımını azalması veya durması sonucu oksijen, glukoz ve gerekli metabolit yoksunluğu ile oluşan hasardır (20). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre inme; vasküler sebepler haricinde her hangi bir sebep yokken global veya fokal beyin fonksiyonuna yönelik belirtilerin ve bulguların hızla kaybı ile karakterize, mortalite ile sonuçlana bilen ya da işlev kaybının 24 saati geçebildiği klinik sendromdur (6).

Serebral iskemik bozukluklar iki geniş kategoriye ayrılır: Global ve fokal (21). Farklı lezyonlar oluşturmalarına rağmen benzer patofizyolojiye sahiptirler (22). Kardiyak arrestte olduğu gibi global iskemi, serebral kan akışını tüm beyin bölgelerinde benzer biçimde etkiler. Global iskemi genellikle yoğun, eksiksizdir ve kollateral akım yoktur; Dolayısıyla, hayatta kalma ile uyumlu iskemi süresi nispeten kısadır (21). Fokal serebral iskemi, beyindeki ilgili damarın suladığı alan etkilenmekte ve kollateral dolaşım sayesinde az da olsa akım mevcut olup global iskemiyeye nazaran daha az şiddetli ve genellikle ölümcül olmayan bir durumdur (21). Kan dolaşımının ani kesilmesinden sonra, beynin içinde iki büyük yaralanma bölgesi vardır: Şiddetli hipoperfüzyonun hızlı hücre ölümüne neden olduğu iskemik çekirdek ve hücrelerin stres altına olduğu, işlevsiz olmasına rağmen yaşanabilir, nispeten daha az miktarda hipoperfüzyona maruz kalan iskemik penumbradır (23).

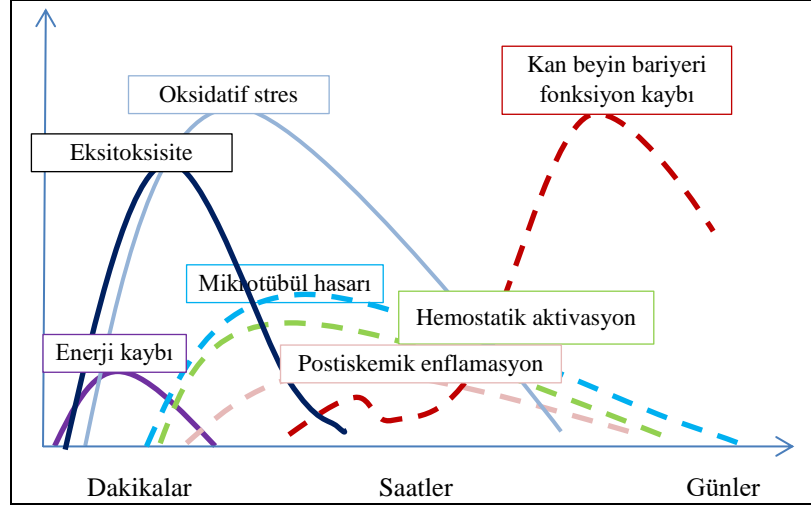
Kısaca core, geçiş zon, penumbra olarak bahsedilmektedir. Core; Hücrelerdeki nekroz oluşan alan, penumbra; Core etrafında ATP ve glukoz varlığından dolayı nonfonksiyone olup canlılığını sürdürebilen, apoptozisin geciktiği bölge, geçiş zonu; Core ve penumbra arasında serebral kan akımının erken

düzelmemesi halinde core ile birleşebilen alan olarak tarif edilebilir (24). Serebral kan akımı normal beyin dokusunda 50-60 ml/100g/dk, core bölgesinde <10 ml/100g/dk, geçici zonda 16-20ml/100g/dk, penumbra da ise 25-30ml/100g/dk üzerindedir (21), (Şekil 1).



Şekil 1. İskemi Yaralanmasındaki Zonlar C: İskemik core bölgesi (<10 ml/100g/dakika'dan az) P1: En yakın iskemik core bölgesi (16-20 ml/100g/dakika'dan az), P2: Hipoperfüze olan bölge (25-30 ml/100g/dakika'dan az), N: Normal serebral dokusu (50-60 ml/100g/dakika).

Serebrovasküler iskemiye takiben eksitoksisite, asid-baz dengesizliği, iyon dengesizliği, nitratif ve oksidatif stres, peri-enfarktüs depolarizasyon, enflamasyon, apoptozis gibi bir çok karmaşık kaskadın etkileşimi sonucu hasar oluşmaktadır (25). Karmaşık, koordine edilmiş ve birbiriyle bağlantılı moleküler olaylar zincirini beyin iskemi ve enfarktüsü izler (26). İskemiye karşı beyaz cevher gri cevherden daha dirençli olduğu gibi hipokampal CA1 bölgesindeki hücreler ile dentat granül hücreleri ve beyin sapı hücreleri ile serebral hücreler arasında da farklı eşikler bulunmaktadır (27). Kısaca anlatılan kaskatlar dakikadan günlere uzanan zaman içerisinde ortaya çıkabilmektedir (21, 23, 26), (Şekil 2)



Şekil 2. Serebral İskeminin Zamansal Görünümü

Adenosin 5'-trifosfat (ATP) üretiminin ve Na^+ / K^+ taşıyıcısının bozulmasından sonra, hücre depolarizasyonu, intrinsek apoptoz yolunun ve hücre ölümünün aktivasyonu ile sonuçlanan Ca^{2+} akışını sağlar (28). Hücre dışı alanda glutamat birikmesi, N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonat (AMPA) ve Ca^{2+} akışına aracılık eden kainat glutamat reseptörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (29). Artmış oksidatif stres, inme sırasında enerji bağımlı süpürücü enzimlerin azaltılması ile birlikte süperoksit, hidroksil radikali, nitrik oksit ve peroksinitrit ile serbest radikal oluşumu ortaya çıkar (30). Serbest radikal üretimi, aynı zamanda araşidonik asit metabolizması, periferik lökositlerin infiltrasyonu, mikroglia ve monositlerin neden olduğu indüklenebilir nitrik oksit sentazın upregülasyonundan da oluşur ve tümü akut inme sırasında görülür (31-33). Serbest radikaller ve Ca^{2+} , inflamatuvar sitokinler (örneğin, Interlökin (IL)-6, tümör nekroz faktörü- α , IL-1) ve kemokinlerin (örneğin, IL-8, MCP-1) yanı sıra endotel hücre adezyon molekülleri (örneğin, Selektinler, ICAM-1, VCAM-1) ve proinflamatuvar genleri indükler (34-36).

Serbest radikaller ayrıca lipid peroksidasyonu, apoptozis indüksiyonu ile sonuçlanır ve Na^+ / K^+ ATPaz, glukoz ve glutamat taşıyıcılarını kovalent olarak modifiye eden 4-hidroksinonenal (HNE) üretimini etkiler (37). Enflamasyon sürecinde kritik olan, iskemik penumbra içindeki proinflamatuvar sitokinler, toksik metabolitler ve enzimler üreten mikrogliaların rolüdür (38, 39). Astrositler ayrıca

proinflamatuar sitokinleri ve nöroprotektif faktörleri (örn.; Eritropoietin, transforme edici büyüme faktörü-b, metallothionein-2) üretirler (40). Endotel değişiklikleri aynı zamanda kan beyinde bariyer disfonksiyonu ve artmış inflamatuvar cevap ile sonuçlanabilir (41). Polimorfonükleer lökositler ve T hücreleri de dahil olmak üzere dolaşımdaki lökositlerin infiltrasyonu, iskemik inmeden sonra düzelmeyi bozar (42-45). İskemik inmeden sonra artmış serebral ödem, hasta prognozunun kötüleşmesinde de rol oynar (46). Sodyum-hidrojen antiporter aile üyeleri, sülfonilüre reseptör-1, geçici alıcı potansiyel melastatin 4 (SUR1-TRPM4) katyon kanalı ve aquaporin-4'ün tutulumu, iskemik inmeden sonra artmış serebral ödemde aracılık yapmakta özellikle önemlidir.

Aynı zamanda hemorajik inme, sitotoksik hemoglobin salımı, akut faz proteinleri haptoglobin ve hemopeksin'in upregülasyonu ve artmış oksidatif stres ile iskemik inmeden farklıdır (47).

2.1. Tarihçe

Serebrovasküler Hastalık (SVH), M.Ö. 460-370 yıllarında Hipokrat zamanından nerdeyse günümüze kadar konvülziyon, çarpma ve ani vurma olarak belirtilen apopleksi olarak adlandırılmış olup; Kişinin başına aldığı darbe sonrası, karşı tarafında kuvvetsizlik ortaya çıkabileceğini, konuşma bozukluğu olabileceği şeklinde de tanımlanmıştır (48, 49).

Emessa'lı Nemesius (4. yy.), görme ve işitme ile ilgili olan frontal lob 1. bölme, mantık ve 3. Ventrikül ile ilgili 2. Bölme, arka beyin ve bellekle alakalı 3. bölmeye ayırdığı "bölme" doktrinini ortaya atmıştır.

625-690 yıllarında Ege'li Paulus, apopleksiyi; Birinci tip: Tüm vücutta kuvvetsizlik ve hissizlik, ikinci tip: Vücudun bir yarısında kuvvetsizlik ve üçüncü tip: Yalnızca bir ekstremitenin tutulumu olarak tanımlamıştır. 932-994 yıllarında İran'lı hekim Ali bin Abbas, daha ayrıntılı anatomik tanımlamayla apopleksinin her üç bölmenin de tutulumuyla ortaya çıkabileceği olarak apopleksi hipotezini geliştirmiş ve 980-1037 yıllarında yaşamış olan İbn-i Sina tarafından daha da genişletilmiştir. 16. yy.'a kadar hastalar genelde kendi haline tedavi edilmeden bırakılırdı (48, 50). Beyin kan dolaşımı ilk olarak gösterildiği 1543 yılında yazılan

De humani corporis fabrica isimli kitabın 16. yy.'ın ünlü anatomisti Padua Üniversitesi'nden Vesalius tarafından insan kadavrası diseke ederek oluşturulan gözlemleri yazılmış ve öğrencisi Fallopius, 1561 yılında beyin damarlarını çizip Willis poligonunu *Observationes Anatomica* adlı kitapında tanımlamıştır. 1658 yılında karotis aterosklerozu tanımlamış, inmenin sebebi olduğu Alman Jacob Wepfer tarafından ileri sürmüştür. 1660 Yılında Willis poligonunun fizyolojik rolü ve geçici iskemik ataklar İngiliz hekim Thomas Willis tarafından tanımlanmıştır. 1754 yılında Von Swieten tarafından kardiyak embolilerinde inme etyolojisinde yer aldığı belirtilmiş. 1783 yılında Monroe-Kellie doktrini ortaya atılmış. 1802 yılında geçici iskemik ataklar İngiliz hekim Heberden tarafından ayrıntılı olarak tanımlamıştır. 1812'de Cheyne subaraknoid kanamanın çizimini yapmış ve aneminin de serebrovasküler hastalığa yol açabileceğini ve ismiyle alınan solunum paternini tanımlamış (48, 51). 18. yüzyılın ikinci yarısında Hipokrat'ın humoral sıvı patolojisi kuramı Morgagni'nin hücresel patoloji kuramıyla yer değiştirmeye başlamıştır. Emboli-trombüs mekanizması, intrakraniyal kanamalar üzerine çalışmaları olan Alman hekim Rudolf Virchow tarafından Morgagni'nin kuramı mikroskopik incelemelerle bilimsel temellere dayandırmış ve hastalıkların hücresel düzeydeki değişikliklerden kaynaklandığını belirttik modern patolojinin de temelini atmıştır. 1874 yılında Charcot ve öğrencisi Duret tarafından beyin damarlarının haritası yayımlanmıştır. 1890 yılında beyin otonöregülasyonu ve beyin fizyolojisi üzerine çalışmalar Sherrington ve Roy tarafından yazılmıştır. 20. yy.'ın başlarında Alzheimer, Binswanger, Chiari başta olmak üzere nöro-histopatolojide önemli çalışmalar yapılmıştır. 1927'de beyin anjiyografisi Portekizli Nörolog Moniz tarafından geliştirmiştir. 1960 yılında Levine S. sıçanlarda deneysel beyin iskemisi yaratarak yayınlamıştır (52). 1969'da karotis arterleri B-mod ultrasonografi ile görüntülenmiştir. Gene aynı dönemlerde salisilik asit serebral vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bilgisayarlı tomografi 1973'de geliştirilmiştir. 1982 yılında Pulsinelli ve arkadaşları 4 damar oklüzyonu sonrası global iskemi modelini yayınlamıştır (53). Asymptomatic Carotid Artery Stenosis Study (ACAS) ve North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) çalışmaları 1990'larda yapılmış, trombolitik tedavi 1990-2000'lerin başlarında yürürlüğe girmiş ve son dekadlarına doğru ve 21. yy'ın başlarında moleküler biyoloji

ile genetiğin gelişmesiyle serebro vasküler hastalıkların sınıflandırılmasına ve patogeneziye yönelik ciddi aşamalar kaydedilmiştir (50).

Eski çağlardan itibaren serebrovasküler hastalıklar konusunda çaresiz kalındı ancak rönasansdan itibaren sebeplerin ve tedavi yöntemlerinin gelişmeye başladığı, modern tedavi yöntemlerinin 20. yy da uygulanmaya başlandığı ancak bu tedavi yöntemlerinde hala optimum başarı elde edilememiştir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalarda da kolay bulunması, ucuz olması, nörokimyasının ve farmakolojisinin diğer hayvanlar göre daha ayrıntılı bilinmesi, serebral dolaşımının insana büyük benzerlik göstermesi nedeniyle sıçanların en çok kullanılan hayvan türü olmasını sağlamıştır.

İskemi Modelleri

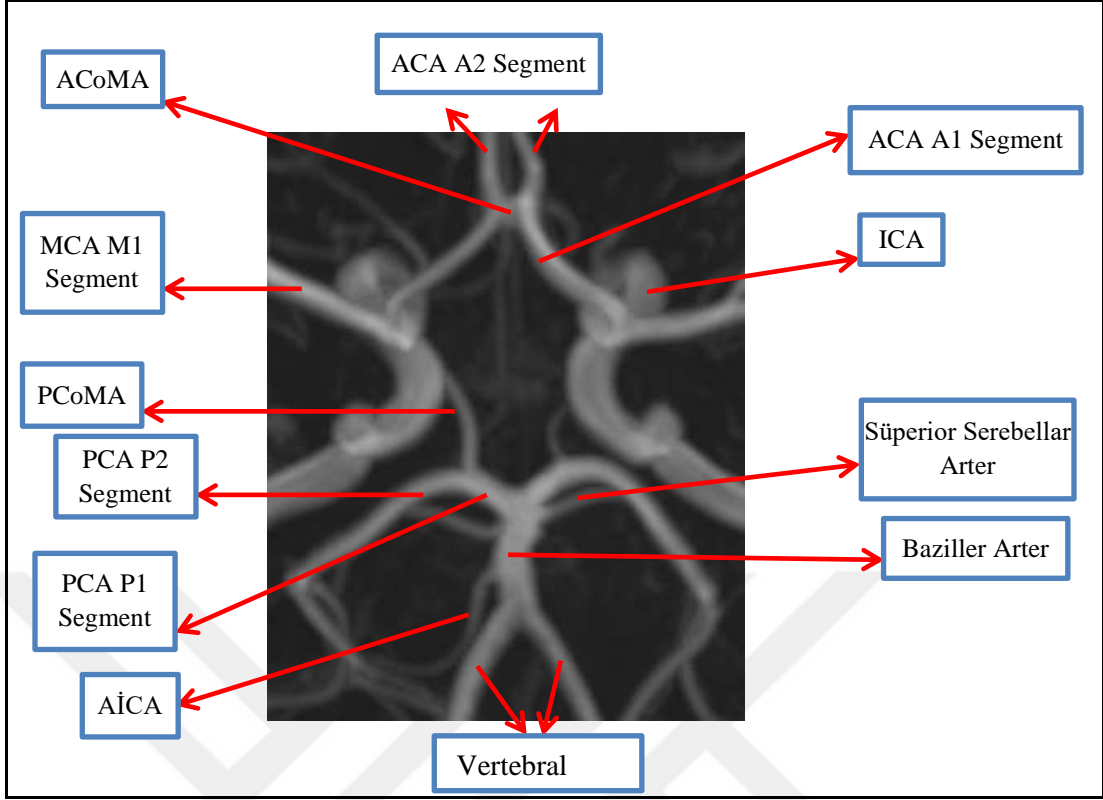
1. *Sıçanlarda dört damar oklüzyon modeli*: Her iki vertebral arterler kalıcı olarak koterize edilir, iki taraflı ana karotis arterler ise geçici olarak 10–30 dakika süreyle klipe kapatılır. İskemi sonrası klipsler kaldırılarak reperfüzyon yapılabilmektedir (54).
2. *Sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modeli*: İki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon ve es zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 30-35 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır. İskemi sonrası klipsler kaldırılarak reperfüzyon yapılabilmektedir (54).
3. *Gerbillerde iki damar oklüzyon modeli*: Bu modelde vertebral arterler gelişemediğinden, her iki karotisin geçici oklüzyonu, Will's poligonunda dolaşım yetersizliği oluşturarak beyin iskemisine neden olur (55).
4. *İki damar oklüzyon modeli*: Her iki internal karotit arter 10-15 dakika boyunca tıkatılması ile striatum, hipokampusun CA1 ve neokorteksin 3-4-5-6. alanlarında seçici hücresel hasar geliştirilmektedir (56).
5. Global ve fokal iskemi sonrası nörolojik değerlendirmeyi Bederson ve ark. yayınlamıştır (57).

2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi

Serebrovasküler anatomiye bilmek iskemi modellerinin anlaşılabilmesi nedeniyle önemlidir.

Vücuttaki toplam kan hacminin yaklaşık% 18'i beyinde dolaşır ve vücut ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturur. Kan oksijeni, besin maddelerini ve beyin dokularının düzgün işleyişi için gerekli diğer maddeleri ve metabolitleri taşır. Beyindeki kan akışı durduktan sonra bilinç kaybı 15 saniyeden kısa bir sürede gerçekleşir ve beyin dokusuna onarılamaz hasar 5 dakika içinde oluşur. Temelde iki taraflı arteria carotis interna ve arteria vertebralislerin birleşimi ile oluşan arteria basillaris tarafından oluşturulan altıgen şekilli Sir Thomas Willis'den adını alan circulus arteriosus cerebri'den (Willis poligonu) ve çıkan arterleri tarafından kanlandırılır.

Beyindeki arteriyel kan, iki çift büyük damar aracılığıyla kafa boşluğuna girer: common carotidlerden dallanan internal carotid arterler canalis caroticus'tan geçerek ve vertebral arterler subklaviyan arterden gelen altıncı servikal vertebradan itibaren processus transversuslardaki foramen'in içinde yukarı doğru devam ederek kraniuma foramen magnum'dan geçerek girer. Karotidler anterior serebral arterler ve anterior communican arter yoluyla birbirine bağlanır. Aynı zamanda vertebral sistemin posterior serebral arterlerine, Willis çemberinin bir parçası olan iki posterior communican arter yoluyla bağlanır.



Şekil 3. Willis Poligonu

Kommon Karotid Arter (KKA): Trunkus brakiosefalikus, arkustan aortadan 4-5 cm sonra, sternoklavikuler eklem hizasında a. carotis communis (CCA) dekstra ve a. subklaviya dekstra olarak ikiye ayrılır. Sol CCA arkustan çıkar ve sternoklavikuler eklem arkasından yükselir. Servikal ve torasik parçalar sol CCA'de, sağ CCA'de ise servikal parça bulunmaktadır. Kraniyale doğru hiç dal vermeksizin nervus vagus ve vena jugularis interna ile birlikte ilerleyerek tiroid kartilajının üst konturu ve 4. servikal vertebra hizasında ikiye ayrılarak a. carotis externa (ECA) ve a. carotis internaya ayrılırlar (58).

Eksternal karotid arter (EKA): EKA, İKA'ya göre mediyal ve anterior yerleşimlidir. Mandibulanın köşesinden posteriyora doğru yönlenecek parotis glandının içerisinde ikiye ayrılır. Sırasıyla A. thyroidea superior, A. pharyngea ascendas, A. lingualis, A. facialis, A. occipitalis, A. auricularis posterior, A. temporalis superficialis, A. maxillaris dallarına ayrılır (58).

İnternal karotid arter (İKA): İKA, tiroid kartilajın üst kenarından yani karotis kommunis'in bifurkasyonundan başlayıp boyunda hiç dal vermeksizin kafa

tabanına ulaşır. Kafa tabanına temporal kemik petroz apeksindeki foramen karatikustan petroz segment olarak girer. Foramen lacerumu üstten çaprazlar. Sella tursikanın inferolateralinden kavernöz sinüse girip sellanın yanından anteriora ilerleyerek karotid sulkusa girer. Anterior klinoid çıkıntıya doğru devam eder (59, 60-62).

İntrakavernöz dalları tarafından dorsum sella, klivus, gasserian ve orta fossa tabanın durası, tentoriumun serbest kenarı, posterior hipofizi ve kavernöz sinüs duvarını besler. Suprakavernöz dalları tarafından kiazma, anterior pituiter lob ve pituiter stalk beslenir. Anterior serebral arter (ASA) ve Orta serebral arter (OSA) İKA'nın terminal dallarıdır (59, 61, 63-65).

Anterior Serebral Arter (ASA): Sylvian fissürün medialinden çıkarak optik sinirin veya optik kiazmanın süperiorundan, medial olfaktor striatın inferiorundan anteromediale ilerleyerek interhemisferik fissüre girer. Anterior komminikan arter vasıtasıyla karşı anterior serebral arter ile birleşir. Lamina terminalis anteriorundan inferiora yönelip hemisferlerin arasından longitudinal fissüre girer. Kortikal dalları verip korpus kallosumun spleniumu üzerinden devam ederek üçüncü ventrikülün tavanında koroid pleksusta sonlanır. Proksimal kısım (A1) orijinden anterior komminikana kadar olan kısmına A1 segmenti, korpus kallosumun rotrum ve genusunun birleştiği yere kadar A2 segmenti, korpus kallosumun genuyu boyunca posteriora açtığı yere kadar A3 segmenti, korpus kallosumun süperiorunda da A4 suprakallosal ve A5 posterokallosal olmak üzere beş segmenti bulunmaktadır (64).

Orta Serebral arter (OSA): Optik kiazmanın lateralinde bulunur. Anterior perforan substansın inferiorundan laterale ilerleyip sfenoid ridge posteriyorundan da laterale ilerleyerek silviyan fissürde dallarına ayrılır. Sylvian fissürün içinden laterale ilerleyerek fissürün operkülünü sular, bu kısma kadar M1 segmenti olarak adlandırılır. Genudan başlayan M2 segmenti insula sulkusunda sonlanır. M3 segmenti de sylvian fissürün superfisiyal kısmında sonlanmaktadır. Fissür yüzeyinden serebral hemisferlerin kortikal yüzeylerine kadar M4 segmenti ve terminal dalıda M5 segmenti olarak adlandırılmaktadır (66-69).

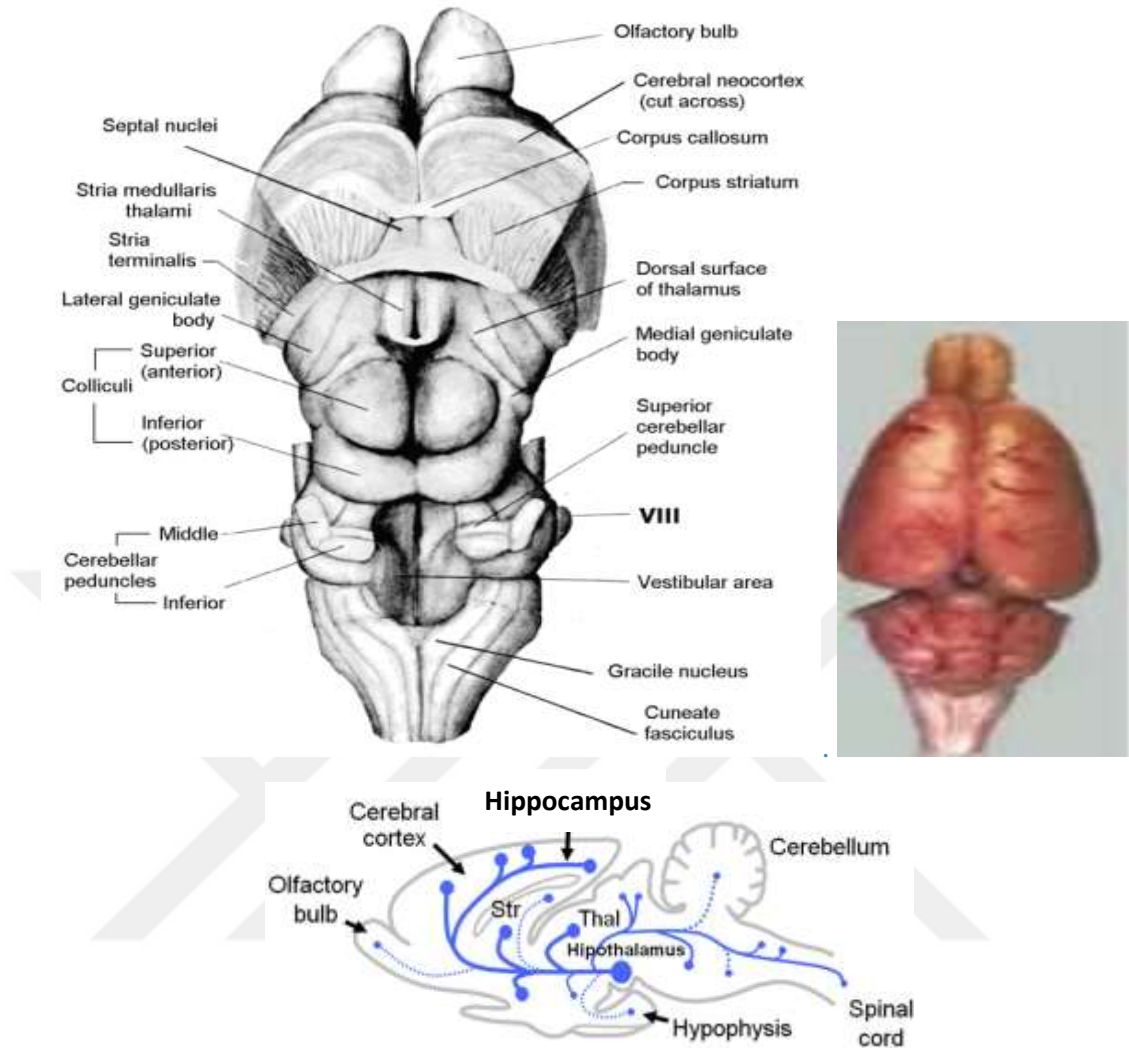
Vertebral Arter (VA): Arterie subklaviyadan ayrılıp 6. servikal vertebradaki foramen transversiyumlarından ilerler ve Atlasdan çıktıktan sonra atlanto-oksipital

membranı delerek foramen magnumdan girer. Lateral serebellomeduller sistemden geçip hipoglossal rootletlerden anteromediale ilerleyerek pontomeduller sulkusa ulaşır ve karşı taraftaki vertebral arterler birleşerek baziller arteri oluştururlar. Birinci segmenti VA'nın subklaviyan arterden orijin aldığı yerden transvers foramene girene kadar olan bölümüdür. İkinci segmenti C2-C6 vertebralar arası transvers foramenlerde uzanan kısımdır. Üçüncü segmenti C2 Vertebra'dan foramen magnum'a kadar olan bölümüdür. Dördüncü segmenti foramen magnum durasından vertebrobaziller bileşkeye uzanan kısımdır (70, 71).

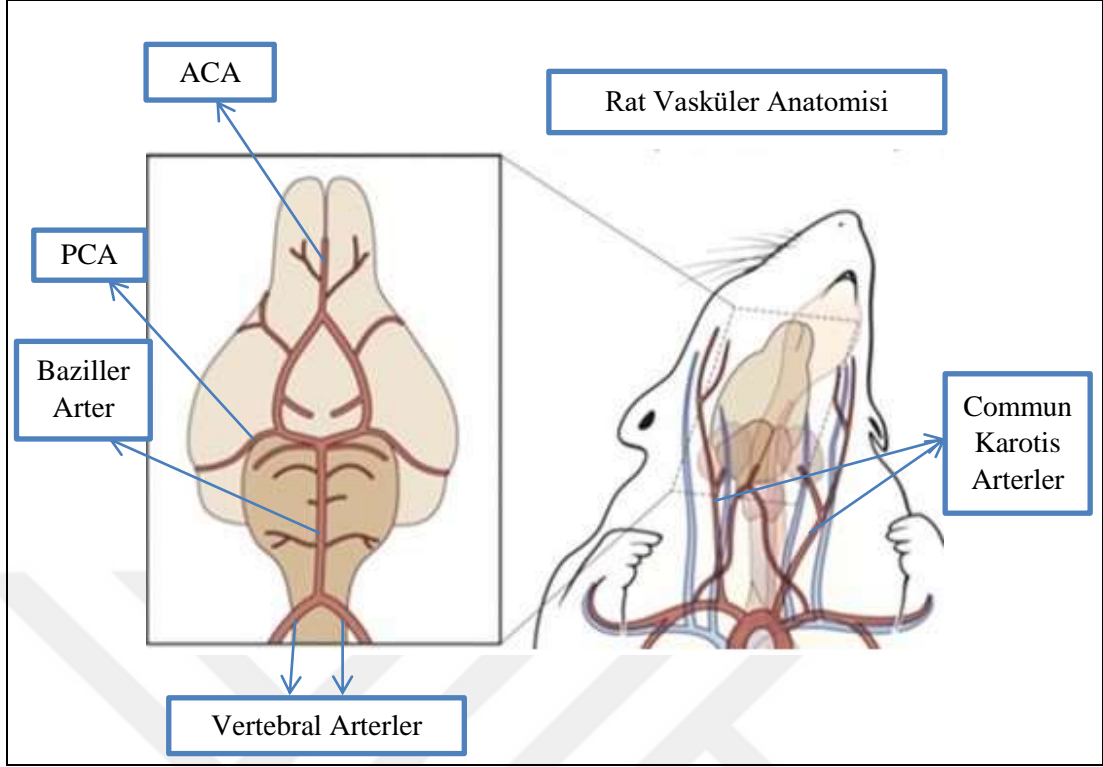
Baziller Arter (BA): Bulbusun süperiyorunda vertebral arterlerin birleşmesiyle oluşur ve pontoserebellar sulkustan prepontin sistem içerisinde süperiyora ilerler. Dorsum sellada interpedinküler sistem içinde posteriyor serebral arterleri verir (59).Vertebrobaziller dolaşım, serebellum, beyin sapı, spinal kord, talamus, bazal ganlia, internal kapsül, inferior temporal korteks ve oksipital korteksin beslenmesini sağlarlar (59).

İntrakranial-Extrakranial Anastomozlar:

1. Occipital arter-Vertebral arter (C1-C2 düzeyinde)
2. Asendan Pharyngeal arter-Vertebral arter
3. Asendan Pharyngeal arter-İCA (Petröz ve Kavernöz dalları ile)
4. Facial arter(Angular dal)-İCA (Oftalmik arterin Orbital dalı ile)
5. Posterior Aurikular arter-İCA (Stylomastoid arter ile)
6. Maxiller arter dalları-İCA
7. Middle Meningeal arter-Oftalmik arterin Etmoidal dalı
8. Foramen Rotundum arter-Inferior Lateral Trunk
9. Aksesuar Meningeal arter-Inferior Lateral Trunk
10. Vidian arter-Petröz İCA
11. Pharyngeal arter-Kavernöz İCA
12. Temporal arter dalları-Oftalmik arter
13. İnfraorbital arter-Oftalmik arter



Şekil 4. Ratların Beyin Anatomisi



Şekil 5. Ratların Beyin Arteryel Anatomisi

2.3. Beyin Dokusu Histolojisi

2.3.1. Nöron

Sinir sistemi yapısal ve işlevsel olarak insan vücudunun en karmaşık organıdır.

Normal beyin fonksiyonu, çoklu hücre tiplerinin anatomik, biyokimyasal ve fizyolojik bütünleşmesine bağlıdır. Nöron sinir sisteminin iletişim hücresidir. Tüm duyu, motor ve bilişsel faaliyetler, kompleks bağlantıları olan çoklu nöronlardan oluşan devreleri kullanır. Bununla birlikte, nöronal gelişme ve fonksiyon, glial hücrelerle uygun etkileşimler ve desteğe ihtiyaç duyar. Astrosit yapısal destek, kan-beyin bariyerinin bakımı ve nörotransmitterlerin, iyonların ve enerji metabolizmasının regülasyonu gibi birçok fonksiyona hizmet eder. Oligodendrositler ve Schwann hücreleri aksonları izole eder, nöronlar arasındaki hızlı iletişimi kolaylaştırır ve aksonal olgunlaşma ve hayatta kalma için gerekli dışsal trofik desteği sağlar. Beyin, mikrogliya adı verilen ikamet eden bağışıklık hücreleri tarafından

korunmaktadır. Gelişme sırasında oligodendrositlere neden olan hücreler, yetişkin beyinde, çok az şey bilen önemli bir glial hücre popülasyonudur (72).

Bir nöronun fonksiyonel komponentleri; Nükleus ve organellerin bulunduğu hücre gövdesi (perikardiyon), çıkan uzantı sayısına göre multipolar, bipolar, psödounipolar olarak sınıflandırılan implusların hücre gövdesiden uzağa iletimini sağlayan akson, diğer nöronlardan veya dış ortamdan uyarıları alan, genellikle hücre gövdesine yakın yerleşmiş olan reseptör uzantıları olan dentritler ve implusların bir nörondan (presinaptik) diğer nörona (postsinaptik) iletimine olanak sağlayan, morfolojik olarak aksodentritik, aksosomatik, aksoaksonik olarak sınıflandırılan sinaptik bağlantılardır (73).

Nöronun hücre gövdesi (perikaryon) belirgin nükleoluslu, büyük, kromatik nükleusu çevresindeki perinüklear sitoplazmayı içeren genilemiş kısımdır (73). Protein sentezi ile uyumlu bir özellik olarak bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve serbest ribozomlar görülür. Protein sentezinden sorumlu ve hücre fonksiyonları esnasında parçalanarak proteinlerin yer değiştirmesini sağlayan Nissl cisimcikleri denen ışık mikroskopunda bazofilik ve metkromatik olarak boyanan granüller alanlar şeklinde görülür. Perikaryon ve dendritte görülmesine rağmen akson çıkışı ve içinde bulunmazlar. Perikardiyonun aksona uzanan kısmında büyük sitoplazmik organellerin bulunmadığı akson ve dentrit ayırt edilmesinde referans olarak kullanılan akson tepciği bulunur (74, 75).

Perinüklear sitoplazma da çok sayıda mitokondriyon, büyük perinüklear golgi aygıtı, lizozomlar, mikrotübüller, nöroflamentler, transport vezikülleri ve inklüzyonlar da içermektedir. Golgi aygıtı ve Nissle cisimcikleri hücrelerin devamlılığı için gerekli anabolik aktivitenin göstergesidir (73).

Nöron hücre iskeletinde mikrotübüller, nöroflamanlar ve mikroflamanlar görülür. Nöroflamanlar, perikaryon ve hücre uzantılarında bulunur, hücreyi desteklemekle ve madde iletimi ile görevli nörofibrilleri oluşturlar. Mikrotübüller, mikroflamanların arasına serpilmiş, hücrenin gövdesi ve uzantıları boyunca uzanan, uzantılarının distal uçlarına doğru madde transportu ile görevli oldukları düşünülen flamandır. Sentioller, mikrotübüllerin yapılandırılması ile ilişkili olduklarına inanılan, olgunlaşmamış ve bölünmekte olan sinir hücrelerinde bulunan küçük, çift yapılarıdır (74, 76).

2.3.2. Glia hücreleri

Nöroglia veya "sinir tutkalı" terimi 1846'da Virchow tarafından kullanıldı ve santral sinir sistemi'nin nöronlarını yerinde tutan aktif olmayan bir bağ dokusu veya çimento olarak tarif etti (72). Aslında sinir hücresi bulunmayan ve extrasellüler alanda meydana gelen olaylar karşısında hücrenin metabolizmasını koruyan, iyon konsantrasyonunu sağlayarak sinir dokusunun beslenmesi, solunumu ve onarımını ile nöronlara destek olan hücrelere nöroglia denilmektedir. Sinir hücresinin gövdesi, akson ve dendrit uzantılarını sararlar. Glia hücreleri için gereken uygun mikroçevreyi sağlar (76).

Santral sinir sisteminde 4 tip nöroglia hücresi vardır:

Astrositler: Beyin hacminin% 20 ila % 50'sini oluşturduğu tahmin edilen santral sinir sisteminin en bol hücreleridir. İyon kanalları, nörotransmitterler, nörotrofin ve diğer hücre yüzeyi reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli moleküllerin farklı ifadelerine dayanan düzinelerce alt türe sınıflandırılabilirler fakat genel olarak üç büyük astrosit alt türünü tanımlanmaktadır: Radyal glial, beyaz cevherdeki fibröz astrositler ve gri maddedeki protoplazmik astrositler (72).

Ekstrasellüler ortamın bileşenlerini düzenleyerek nöronal aktiviteyi kontrol edebilirler, fazla miktarda salınmış nörotransmitterleri absorbe edebilirler, metabolik ve nöroaktif moleküller salgılayabilirler. Astrositler metabolitlerin ve artık ürünlerin taşınmasını sağlayan, intersellüler alanın iyon kompozisyonunu düzenleyen, kan-beyin bariyerini oluşturan sıkı bağlantı komplekslerinin fonksiyonlarını düzenleyen, ölen nöronların ve glia hücrelerinin yerini çoğalarak dolduran çok fonksiyonlu hücrelerdir. Morfolojik olarak heterojen hücrelerdir. Merkezi sinir sisteminin nöronlarına fiziksel ve metabolik destek sağlarlar. Bazı astrositler beyin tüm kalınlığı boyunca uzanarak beyin gelişimi sırasında göç etmekte olan nöronlar için bir iskelet oluştururlar (77).

Oligodendrositler: Nükleusları astrosit nükleuslarından daha küçük, heterokromatik ve düzensizdir. Hücre gövdesinden birkaç adet kısa sitoplazmik uzantı çıkar. Sitoplazmaları astrositlerden daha yoğundur. Büyük golgi kompleksi, bol mitokondriyon, ribozom ve mikrotubuller içerir. Bu hücrelerin bir kısmı gri cevherde nöronlar çevresinde (satellit, uydu oligodendrositler), bir kısmı beyaz

cevherde sinir lifleri arasında (interfasiküler oligodendrositler) bulunur. Bir kısmı da damarlar çevresinde (perivasküler oligodendrositler) yer alır. Santral sinir sisteminde miyelin yapımından sorumludurlar. Periferik sinir sisteminde bu işten sorumlu olan schwann hücrelerinden farklı olarak oligodendrositlerin çevrelerinde bazal lamina bulunmaz ve bu durum aksonla direk temas kurmalarını sağlar. Hücrenin uzantılarının akson çevresinde dönmesi sonucu miyelin kılıf ortaya çıkar. Miyelinizasyon sırasında hücrede miyelin için spesifik pek çok protein üretilir ve sentezlerinin bozulması demiyelinizan hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar (77).

Ependim hücreleri: Ventrikülleri ve spinal kanalı döşeyen tek katlı kübük epitelyum görüntüsü veren hücrelerdir. Hücrelerin apikal bölümlerinde mikrovilluslar ve silyumlar bulunur. Bazal lamina ile sınırlanmamışlardır. Tipik sıvı transportu yapan hücre özelliği gösterirler. Silyumlar ile serebrospinal sıvının hareketini kolaylaştırırlar. Beynin bazı bölümlerinde ependim ve altında yer alan kapiller damarlar beyin omurilik sıvısını oluşturmak üzere değişikliğe uğrarlar ve bu yapılara plexus koroideus denir. 3. ve 4. ventrikülün tavanında ve lateral ventrikülün duvarının bir bölümünde yer alır ve yüzeyi ependimle döşeli piameter katlantılarından ibarettir. Ependim hücreleri iyon taşıyan hücre özelliğindedir (77).

Mikroglia: Fagositoz yapabilen bu hücreler diğerlerinden farklı olarak kemik iliğinin monosit öncüsü kök hücrelerinden köken alırlar. Colony Forming Unit-Granulocyte/ Macrophage (CFU-GM), santral sinir sistemi parankimasına damarlar yolu ile girerler, hasarlanma veya hastalık durumunda çoğalarak aktif olarak fagositoz yapan hücreler haline dönüşürler(77). Küçük, düzensiz şekilli, uzunca nükleusları koyu boyanır. Hücre gövdesinden az miktarda ince sıklıkla dallanarak ilerleyen sitoplazmik uzantılar çıkar. Erişkin santral sinir sisteminde doku tamiri ve inflamasyonda görev alırlar. Lizozom inklüzyon ve vezikülden zengin hücrelerdir(77). Mezenkimal orjinli olduğu için uzantıları vimentin intermediyer filamentinden zengindir. İmmunoregülatuar sitokinleri salgılayabilir, oluşan istenmeyen hücre artıklarını temizlerler(73). İnvazyon yapan mikroorganizmalara ve neoplastik hücrelere karşı yapılan savunmada kritik role sahiptir. Bakterileri hasarlanmış hücreleri ve apopitoza giden hücre yikıntılarını ortamdan uzaklaştırırlar. Kronik ağrı

durumlarında oluşanlar gibi nöroimmun reaksiyonlarda aracılık ederler (73). Nöroglial hücrelerin en küçüğüdür küçük yassı nükleusu vardır (73).

2.4 Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik ve Histolojik Özellikleri

Hipokampus, denizatına benzemesi nedeniyle yunanca kökenli olan “hipokampus” ismi verilmiştir. Dış yüzü koç boynuzuna benzediğinden dolayı adını koç başlı mısır tanrısı Ammon’dan alarak cornu ammonis (CA) ismi ile de anılmaktadır ve bundan dolayı bölümleri CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak kısaltılmıştır (78, 79). Koroid fissürün dış parçasından gelişmeye başlar dorsalde yer alıp sonra temporal lobun ventral ve medialine yerleşir sonrasında temporal lobun bir bölümünü, lateral ventrikülün ventral yüzünü oluşturmak üzere içeri katlanarak şekillenir (80, 81). Gestasyonun 13-14. haftalarında temporal lob medial yüzde hipokampal fissürle çevrilidir, 15 ve 16. haftalar içerisinde dentat girus ve kornu ammonis içe katlanmaya ve 18 ile 20.haftalarda da erişkin hipokampusuna benzemeye başlar, aynı zamanda hemisfer duvarı kalınlaşır ve ventrikülün medialine doğru çıkıntı yaparak hipokampusu meydana getirir (80, 82, 83).

Ventriküler yüzeyden dışa doğru, 7 tabakaya ayrılmıştır fakat bazen stratum lakünozum ve stratum molekülare bir kapul edilerek stratum lakünozum–molekülare olarak da 6 tabaka kabul edilebilmektedir (80-83).

1. Piramidal hücre aksonlarını içeren, fimbria/fornikse uzanan aksonların geçtiği Alveus.
2. Piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği Stratum oriens.
3. Piramidal hücrelerin, internöronların gövdelerinin bulunduğu, Golgi tip 2 hücre yoğunluklu, Dentat girusdan CA3 alanına giden yosunsu (Mossy) lifler ile yapılan sinapsların olduğu Stratum pyramidalis.
4. Motor tip piramidal hücrelerden oluşan, yosunsu (mossy) lifleri içeren en ince tabakası olan Stratum lusidum
5. Septal, komissural lifler ve CA3’dan CA1’e projeksiyon lifleri olan Schaffer kollateral lifleri içeriren Stratum radiatum

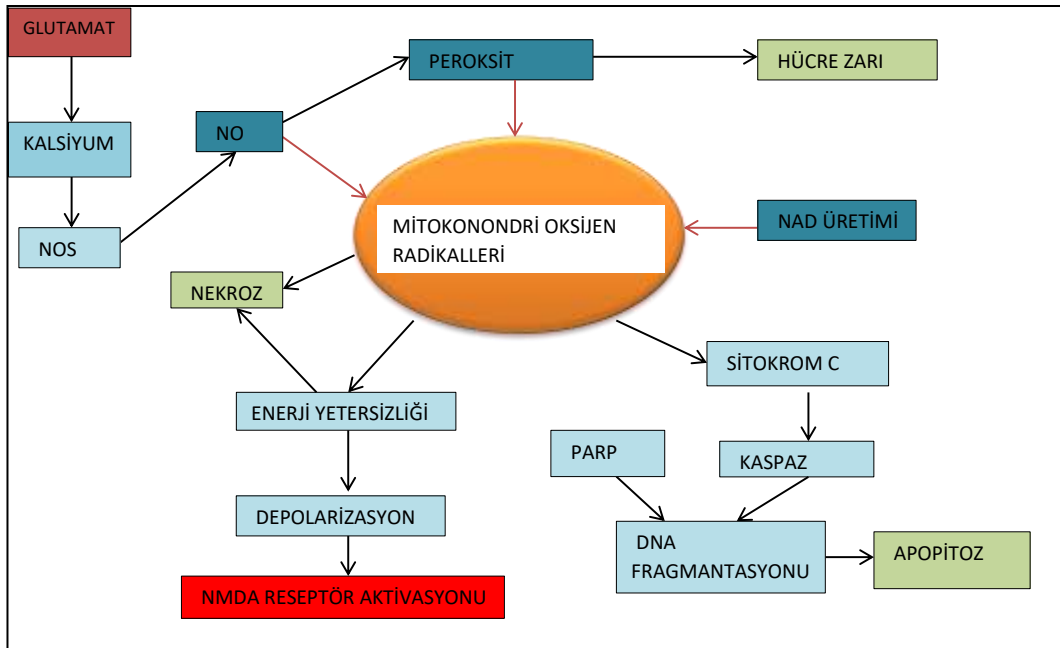
6. Süperfisyal tabakadan entorinal kortekse uzanan perforan lifler ve Schaffer kollateral lifleri içeren Stratum lakünozum.
7. Perforan lifler ve piramidal hücrelerin apikal dentritler bulunduğu en dıştaki Stratum molekülare olarak adlandırılır.

Hipokampusun ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü konkav, digitationes hippocampi olarak adlandırılan 2-3 adet çıkıntı bulunan pes hipokampi, geniş ve düzdür (80, 84). Alveus liflerinin medialde yaklaşarak fimbria hippocampi meydana getirir, ön ucu uncuda sonlanır, arka ucu alveus ile ile Crus fornicis'i oluşturur. Cornu ammonis'i temsilen CA olarak hücre yapılanmasına göre CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt bölgeye ayrılır. CA1 subikuluma, CA4 de dentat girusa en yakın olan bölgesidir. Bellek ve öğrenme için gerekli olan CA1 bölge nöron hücreleri, entorinal korteksten shaffer kollateral lifleri aracılığıyla CA3 bölgesinden bilgileri alıp birbirleri ile uyum kontrolü yapar (80, 84-86). Hipokampus, posterior serebralarter ve dalları, anterior koroidal arter ve dalları, anastamozları ile beslenir. CA3 ve CA4 küçük ventral hipokampal arterler ile CA1 ve CA2 geniş ventral hipokampal arterler ile beslenir (87, 88). Sulkal ve subepandimal intrahipokampal venler ile süperfisyal hipokampal vene drene olup 2 adet ark oluşturu önden inferior ventriküler ve arkadan da medial atrial ven ile bazal vene drene olurlar (88).

2.5. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi

Dokularda kan dolaşımının aksaması sonucu gerekli olan oksijenizasyonun yetersizliği veya tamamen kesilmesi ile meydana gelen patoloji iskemi olarak tanımlanır. Her doku iskemiden farklı derecelerde etkilenirken, özellikle nöral dokuda kan dışında oksijen kaynağı bulunmaması ve rejenerasyon yeteneğinin olmaması sebebiyle meydana gelen oksijen yetersizliği hücre ölümlerine neden olmaktadır. Doku harabiyet derecesini iskemi süresi ve derinliği belirlemektedir. İskemi sonrası oluşan hipoksi nedeniyle hücreler ihtiyacı olan hazır enerji kaynağı ATP'yi anaerobik glikolizde pürivattan laktata giden yolla üretmek zorunda kalırlar. Bu durum hücre pH'sının düşmesine, oksidatif stres baskısı altında serbest radikallerin artmasına ve enerji üretiminin yetersizliğine neden olur (89)

Fizyolojik şartlarda 3-4 dakika iskemik durumun devam etmesi ortamda hazır bulunan ATP miktarının tamamen bitirmekte ve elektron transfer sistemi (ETS) gibi oksidatif reaksiyonların meydana geldiği mitokondri aktivitelerini durdurmaktadır. Hazır enerji kaynağı ATP'nin hücre içinde tükenmesi buna bağlı çalışan hücre sıvı dengesini sağlayan membran portlarının durmasına yol açmaktadır (90). Bunun yanı sıra nöral dokuda iskemiden kısa bir süre sonra gri ve beyaz cevheri oluşturan dokunun ekstrasellüler alanında hidrojen ve potasyum konsantrasyonunda önemli bir artış gözlenir. Nöral hücre etrafında yükselen potasyum konsantrasyonu nöron membranında depolarizasyon meydana getirerek iletim blokajına ve regülyonsuz transmitter salınımına sebebiyet verir (91). Özellikle glial hücrelerin membranlarında meydana gelen depolarizasyon eksitator glutamati da içeren nörotransmitter maddelerin geri alınımında azalmaya ve bu nedenle hücre içi sodyum, kalsiyum ve su artışı meydana getirir. Bu durum glial hücre içi sıvı basıncının da artmasına yol açar. Hücre arası boşlukta artan potasyum, hidrojen ve laktik asit konsantrasyonu pH'nın düşmesine sebebiyet verir. Ortamın asitleşmesi sonucu glial ve nöral hücre membranlarında hasar oluşabilir ve/veya membranda bulunan iyon kanallarının aktivitesini yitirmesi sonucu N-metil-D-aspartat reseptör aksiyonunun blokajı meydana gelebilir (92), (Şekil 6).



Şekil 6. NMDA Reseptör Aktivasyonu

Kalsiyum iyon dengesinin bozulması irreversible hücre hasar proçesinin başlamasında en kritik noktadır. İskemik durumda hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun önemli derecede artışı sitoplazmada bulunan proteaz ve nükleaz enzimlerin aktivitesi arttırmaktadır. Bu enzimler hücre içinde bulunan yapı proteinleri ile DNA yapılarının hasar görmesine neden olurlar. Kalsiyum aynı zamanda araşidonik asit metabolizmasının önemli enzimleri olan fosfolipazları aktive ederek membran yapısını oluşturan fosfolipitlerin prostoglandin, tromboksan ve lökotrienler gibi vazoaktif maddelere dönüşümüne sebebiyet verir. Bunun yanı sıra endotelial yapıda bulunan ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin yıkımı sırasında süperoksit radikal üretimine neden olan ksantin oksidaz enzimine dönüşür. Bu dönüşüm reperfüzyon sonrasında meydana gelen süperoksit radikal patlamasında ana noktalardan biridir. Özetlenecek olursa, hücre içi kalsiyum akümüasyonu nörotoksiteden sorumlu iki madde olan aspartat ve glutamat konsantrasyonunun artmasına sebebiyet verir (90).

Hücrenel enerji ve sıvı dengelerinin yeniden sağlanması oksijence zengin kan akımının iskemik dokuya tekrar reperfüze olması ile gerçekleşir (89). Fakat bu dengeye ulaşma sırasında meydana gelen toksik yapılar ile oksidatif stres ajanlarının sebep olduğu doku hasarı ve negatif etkileri hala araştırılan güncel bir konudur.

Dokuyu besleyen dolaşımın aksamasiyla meydana gelen iskemi durumunda hazır enerji kaynağı ATP kısa sürede kullanılarak yıkıma uğrar. Bu yıkım sonucunda ortamda ksantin ve hipoksantin konsantrasyonu yükselir. Hipoksantin ve ksantin bulunan ortama hücrede oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında kullanılan nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADPH) eklenmesi ksantin oksidaz enzimini aktive ederek çeşitli süperoksit radikallerini oluşturabilir.

2.6. Glutamat Eksitotoksitesi Ve Kalsiyum Sitotoksitesi

Nöral dokuda iskemi eksitatör aminoasitler (EAA) olarak bilinen glutamat ve aspartatın konsantrasyonunda artış ile oluşan “eksitotoksite” prosesinin başlaması ile sonuçlanır. Bu aminoasitler beyin ve spinal kord dokusundan dengesiz bir dağılımda bulunurlar (93). Aynı zamanda iskemi ile ATP tüketimi sonucu intersellüler dengenin düzenleyicileri olan Na-K pompası gibi enerji gerektiren

taşıma sistemlerinin durması meydana gelir. Bu sistemlerin aksaması sonucu hem hücre içi hem de hücre dışı alanda iyon dengesinde kayma meydana gelir. Bu dengenin bozulması ile hücre membran polaritesi değişerek sinaptik kese kaynaklı EAA'lerin ortama verilmesinde artış gelişir. EAA'lar nöron ve glial hücrelerde enerji gerektiren transport sistemlerinin durmasıyla geri alınamazlar ve ortam dengelenemez (94).

Geçmiş çalışmalar glutamat reseptör aktivitesinin EAA tarafından meydana gelen geç doku hasarında önemli olduğunu bildirmişlerdir (91). Yakın zamanda yapılan araştırmalar ile glutamat reseptörleri “metabotropik” ve “iyonotropik” olarak iki ana grubu ayrılmıştır.

Glutamat asidik yan zincire sahip, metabolizmada karbonhidrat ve amino asit metabolizmasında ortak havuzluk görevi olan, merkezi sinir sisteminde yüksek konsantrasyonda bulunan EAA'dır. Sinirsel faaliyetlerden olan öğrenme, hafıza, hareket ve duysal bağlantı oluşturulması gibi görevleri yerine getirmede kullanılır (95). Bu etkilerini kendine spesifik reseptörler aracılığıyla sağlar:

1. İyonotropik Glutamat Reseptörleri: İyon kanalları üzerinden etkilerini gösteren reseptörlerdir.

- α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) reseptörleri
- N- metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri

2. Metabotropik Glutamat Reseptörleri: Membranda trans bir şekilde yerleşmiş proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Reseptörün aktive edilmesi ile G proteini (GTP aracılıklı sinyalizasyon) ile reaksiyon başlatır (96).

İskemi durumunda glutamat salınımında önemli derecede artış olurken, diğer bir taraftan enerji ile gerçekleşen perisinaptik geri alım sistemi bozulur. Bu durumda hücreler arası boşlukta glutamat konsantrasyonunun aşırı miktarda artışı şekillenir. Glutamattaki bu aşırı artış NMDA ve AMPA reseptörlerinin uyarılmasına neden olur, böylece sürekli ve güçlü depolarizasyon gerçekleşir. Beyin dokusunda meydana gelen iskemi çok miktarda eksitator aminoasitlerin salınımı ile gerçekleşen nöronal hasara “eksitotoksisite” olarak adlandırılır (97). Ayrıca NMDA ve AMPA reseptörleri vasıtasıyla takiben meydana gelen depolarizasyon neticesinde voltaj

aracılı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile yüksek konsantrasyonda Ca^{+2} intrasellüler alana geçer.

Ortamın normal koşullarında hücre dışı Ca^{+2} derişimi hücre içi alandaki konsantrasyona göre 10.000 kat fazladır. Bu derişimin artmasıyla kalsiyum iyonu meydana gelen voltaj farkı veya ATP bağımlı portlar aracılığı ile endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondriye geçer ve buralarda birikmeye başlar. Bu birikimin fazlaca artması durumunda kalsiyum iyonu, ER'de glutamata ait metabotropik reseptörleri aktive ederek, mitokondride ise mitokondrial permeabilite transit (MPT) portları aracılığı ile organelin dışında yani hücre sitoplazması içine geçmektedir. Buradan Ca^{+2} hücre dışına Na-Ca taşıyıcı sistemi ve ATP bağımlı kalsiyum pompaları ile ekstrasellüler alana çıkarılmaktadır. Bu şekilde hemostaz sürekliliği gerçekleşmektedir (98).

İskemi baskısı altında Ca^{+2} konsantrasyonunun fazlaca yükselmesi endoplazmik retikulum ve mitokondri ile intrasellüler alana geçmektedir. Fakat ekstrasellüler alanda meydana gelen pH düşmesi gibi etmenler sonucu aktivitesi bozulan membran pompaları nedeniyle hücreye akümüle olan Ca^{+2} ekstrasellüler alana çıkarılamamaktadır. Bu durum intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunda kontrolsüz artışa sebep olur (98).

Büyük miktarda Ca^{+2} hücre içine glutamat reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda özellikle de NMDA reseptörleri aracılığıyla giriş yapar. Bu iyon NMDA reseptörleri aracılığıyla geçerken, AMPA reseptörleri aracılığıyla Ca^{+2} haricinde bir değerlikli katyoların geçişine izin verilir. Bu şekilde hücre içine Ca^{+2} yanında Na^{+} girişi gerçekleşir. Na^{+} 'nın hücre içi konsantrasyonunun artması suyun pasif diffüzyon yoluyla hücre içine geçmesine sebebiyet verir. Artan intrasellüler sıvı basıncı ile hücre hacminin artması gerçekleşir ve perfüzyonda aksamaya sebep olur. İntrakranial basıncın yükselmesiyle herniasyon ve vasküler baskı şekillenir, bunun sonucu olarak beyin ödeminin erken safhası başlar (95).

Kalsiyum iyon dengesinin bozulması hücre hasar mekanizmasının başlangıcındaki en önemli durumdur. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu iskemi esnasında hızlı bir şekilde artmaktadır. İntrasellüler gerçekleşen bu artış çok sayıda enzimin aktive olmasına yol açar. Aktive olan fosfolipaz, proteaz, ATP'az ve endonülez sınıfı enzimler hücrede hasar meydana getirirler (28). Bunun yanı sıra

hücre kompartımanlarında biriken Ca^{+2} 'nin salınması ile mitokondri ve ER'de bulunan kalsiyum kanalları inaktive olur. Bu nedenle glutamat konsantrasyonu normal seviyeye inse bile intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu geri dönüşümsüz olarak yükselir. Sonuç olarak intrasellüler artan Ca^{+2} , bu iyonla bağı olan lipaz ve proteazların aktivasyonuna neden olarak hücre membran ve iskeletinin hasar almasına neden olur (99).

2.7. Serbest Radikaller

Bir atom veya molekülün orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulundurması ile meydana gelen aşırı reaktif, kısa ömürlü ve kararsız yapılar "serbest radikal" olarak isimlendirilirler (100). Demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri olarak adlandırılan atomlar da eşlenmemiş birer elektrona sahip olmalarına rağmen serbest radikaller gibi davranmazlar. Oksijen hücrede en büyük serbest radikal kaynağı olarak belirlenmiştir. Çünkü oksijen orbitallerinde bir çift eşlenmemiş elektron bundurmaktadır. Ayrıca oksijen serbest radikallerle çok kolay şekilde reaksiyona girerken radikal olmayan yapılarla çok daha zor reaksiyona girer. Bu nedenle oksijenli solunum yapan canlılar serbest radikallerin en çok meydana geldiği gruptur (101). Hücrede meydana gelen enerji, yapım ve yıkım reaksiyonlarında normal koşullar altında da serbest radikal oluşumu gözlenir. Özellikle mitokondri içinde ceyran eden elektron transportu sonucu meydana gelen elektron kaçakları bunun başlıca örneğidir. Bunun yanı sıra üre metabolizmasında görevli bir enzim olan ksantin oksidazın aktivitesi ile amonyağa dönüştürülen ksantinden kaynaklı yine radikal meydana gelir. Normal şartlar altında bile hücrede önemli seviyede serbest radikal oluşumu gözlenirken patolojik durumlarda bu oluşum kat ve kat artmaktadır. Serbest radikaller son yörüngedeki eşlenmemiş elektronu çiftleme eğiliminde olduklarından aşırı seviyede reaktif özellik gösterirler. Bu sayede çok sayıda intrasellüler molekül ile reaksiyona girerek farklı yapıların oluşmasına sebebiyet verebilirler. Canlıda en çok oksijen kökenli olan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), nitrik oksit (NO) ve azot dioksit (NO_2) meydana gelirken, karbon merkezli radikaller ($R\cdot$), peroksil

radikalleri (ROO[·]), alkooksil radikalleri (RO[·]), tiyol radikalleri (RS[·]) gibi diğerk tür radikallerde şekillenebilir (102).

Hücre değerkendirildiğinde süperoksit radikalının en çok meydana geldiğı alan mitokondri elektron transport sistemidir. Hücrenin doğıal faaliyetleri sırasında %2-5 arasında elektron transport sistemi vasıtasıyla süperoksit radikali hidrojen peroksit oluşu gerçekleşir. Bu radikaller hücrede bulunan çeşitli enzim ve moleküller tarafından nötralizasyon ile bertaraf edilir. Bu göreve sahip tüm yapıların meydana getirdiğı sistem “Antioksidan Savunma Sistemi” olarak ifade edilir. Bu sistemi oluşturan enzimler; glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), miyeloperoksidaz (MPO) iken, moleküller ise; glutatyon (GSH), Vitamin A, E ve C’dir. Bunların dışında eksojen kaynaklı bir çok antioksidan özellikli molekül bulunmuştur.

Süperoksit dismutaz enzimi Cu-ZnSOD (ekstrasellüler) ve Mn-SOD (mitokondri) gibi çeşitli izoenzimlere sahiptir. Süperoksit radikaline dismutasyon reaksiyonu gerçekleştirerek sonuç olarak H₂O₂ ve O₂ meydana getirir. Meydana gelen H₂O₂ hücre için hala zararlı ve toksik bir etkiye sahip olduğundan CAT ve GSH tarafından suya dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (103). Bu süreçte GSH, GPx enzimi tarafından indirgenerek GSSG formuna dönüştürüldüğünden tekrar geri kazanım için GSSG, GR enzimi tarafından tekrar GSH’a dönüştürülür. Ortamda GSH miktarının azalması veya GPx enziminin aktivitesinin azalması veya direkt olarak CAT enzimi hidrojen peroksidin suya dönüşüm görevini gerçekleştirir (104, 105). Bunun yanı sıra yardımcı antioksidan moleküllerden olan vitamin A, E ve C yapılarında bulunan serbest OH grupları sayesinde süperoksit radikallerini direkt olarak nötralize edebilirken aynı zamanda primer savunucuların işleyişinde ve rejenerasyonunda da görev alırlar. Örnek verilecek olursa vitamin E hem GSH geri çevriminde koenzim olarak yardımcı bir görev üstlenirken aynı zamanda yapısından dolayı hücre membranı içine yerleşerek süperoksit radikalleri tarafından meydana getirilebilecek hasarı serbest OH gruplarıyla engeller (106).

Serbest radikaller hücrenel hasar mekanizması çok çeşitli olsa da en çok membran fosfolipidlerinin hasar gördüğü bilinmektedir. Bu radikaller tarafından membran yapısında bulunan fosfolipidlerin özellikle de çift bağılı olanlarla reaksiyona girerek malondialdehid (MDA) olarak adlandırılan yapıyı meydana

getirirler. Lipid peroksidasyonu olarak da adlandırılan bu olay sonucunda membran akışkanlığı ve viskozitesi bozularak sert ve kırılğan bir hal alır. Bu durumun ilerlemesi zincirsel bir reaksiyon sonucu gerçekleşir ve sonuçta membran yeterli şekilde tamir edilmezse bu bölgelerden yırtılarak hücre ölümü gerçekleşir. Bunun dışında bazı fonksiyonel ve yapısal proteinlerin yanı sıra DNA üzerinde de benzer hasarlar meydana gelmesiyle hücre hayati reaksiyonların durmasına veya mutasyonlar meydana getirerek hücre ölümü veya kansere sebebiyet verebilmektedir (105).

İskemide öncelikle oksijenizasyon yetersizliği ile hücre fonksiyonlarında ve yapımda azalma sonucu antioksidan savunma ajanlarının sayı ve etkinliğinde azalma meydana gelir. Bu azalmanın şiddeti iskemi süre ve bölgesiyle farklılık gösterebilir. Asıl serbest radikal hasarı reperfüzyon sonrası meydana gelir. Reperfüze edilen doku hücrelerinde ani artan mitokondriyel aktivite ile birlikte oksidatif reaksiyonlar radikal patlamasına sebep olarak hasarın hızlı ve şiddetli bir şekilde artmasına neden olur. Hücrede azalan savunmanın üstüne bu patlamanın eklenmesi ile kaçınılmaz yaygın bir doku hasarı meydana gelir. Hücrenin her bölgesinde özellikle iskemide meydana gelen süperoksit, hidroksil, nitrik oksit ve peroksinitrit radikalleri hızlı bir şekilde membran ve hücre içi yapılarda hasar meydana getirir (107). Bunların yanı sıra serbest radikaller hücreye çeşitli şekillerde etkide bulunabilirler;

Membran Lipidlerine Etkileri: Serbest radikaller membranda LPO'yu başlatırlar. LPO, poliunsature yağ asitlerinin radikallerle oksidasyona uğraması sonucu başlayan ve otokatalitik bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen, birçok yapıda hasarın meydana geldiği bir süreçtir. Yağ asitlerinde meydana gelen değişim geri dönüşümsüzdür. Başta karbon merkezli bir lipid radikali meydana gelirken devamında hidroperoksitleri meydana gelir ve zincirleme reaksiyon bu peroksitlerin diğer yağ asitleri ile reaksiyona girmesiyle devam eder (108).

Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri: Serbest radikaller deoksiriboz ve nükleik bazlarla hızlı bir şekilde reaksiyona girmesi sonucu molekül üzerinde değişikliklere neden olur. DNA'da meydana gelen değişimler özellikle oluşan hidroksil radikali mutasyonlara sebebiyet verebilir. Hidroksil radikalleri nükleik asitlerde doymuş karbon atomunda hidrojen alınması veya çift bağlara katılmalarıyla bu değişimi gerçekleştirir. Ayrıca aktive olmuş nötrofil veya SOD enzimi tarafından

oluşturulan H₂O₂ hücre çekirdeğinde DNA'da oksidatif hasar meydana getirerek kanser gelişimine veya genetik çeşitli mutasyonlara da neden olabilir (109, 110).

Proteinlere Etkileri: Proteinler diğer hücresel yapılarla karşılaştırıldığında serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteini oluşturan aminoasit konformasyonu etkilenme derecesini belirleyen en önemli faktördür. Fenil alanin, triptofan, tirozin, histidin, sistein ve metiyonin gibi Çift bağlar ve sülfür içeren aminoasitlerden zengin proteinler serbest radikallerle daha kolay tepkimeye girmektedirler. Bu tepkimeler sonucu karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelmektedir. Böylelikle proteinlerde parçalanma veya proteinler arasında çapraz bağlar şekillenerek yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelir (111).

Karbonhidratlara Etkileri: Serbest radikaller monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana getirirler.

Serbest radikaller canlı hücrelerinde normal hayati süreçte gerçekleşen reaksiyonlardan kaynaklansa da, en önemli kaynağı stres ve hastalık durumlarıdır. Bu nedenle serbest radikallerin kaynakları endojen ve eksojen olarak iki gruba ayrılır (Tablo 1).

Tablo 1. Serbest Radikal Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar

Eksojen Kaynaklar	Endojen Kaynaklar
<ul style="list-style-type: none">• Toksik maddeler• Antibiyotikler• Anestetikler• Sigara dumanı• İskemi• Hipoksi• İnflamasyon• Antineoplastik ajanlar• Hava kirliliği• UV Işık• Radyasyon	<ul style="list-style-type: none">• Mitokondrial aktivite• Mikrozomal reaksiyonlar• Plazma transportları• Fagositik aktiviteler• Peroksizomal reaksiyonlar• Bazı sitozolik enzimler

2.8. Miyeloperoksidaz (MPO)

Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi 140 kDa molekül ağırlığına sahip iki heterodimer halinde tetramerik yapıda glikoprotein ve hemoproteindir. Enzim yapısında demir içeren hem grubu yanı sıra kalsiyum iyonu barındırır. Nötrofil ve lökositlerin granüllerinde depo edilen bu enzim bu savunma hücrelerinin aktivasyonu sonrası ekstrasellüler alana ve fagolizozomal alana salınır. Bunun sonucu olarak salınan ortamda bulunan klor iyonu başta olmak üzere halojenleri (F, Br, I) ve bazı inorganik molekülleri reaktif türlere dönüşümünü katalizlerken süperoksit radikalleri ile H₂O₂ patlamasına yol açar. Bu MPO'nun antibakteriyel etkisinin mekanizmasının temelini oluşturur. Oluşan H₂O₂ daha sonra ortamdaki Cl iyonu ile reaksiyona girerek hipokloröz asit (HOCl) meydana getirir. Bu asit organik membranlar üzerine oksidan etki göstererek bakteri duvarı ve membranını yıkımını sağlar. Fakat bu süreçte meydana gelen radikaller etrafında bulunan diğer hücrelerde ve kendisinde protein ve DNA hasarlarına yol açabilmektedir (112, 113).

2.9. Lipit Peroksidasyonu ve Malonaldehit (MDA)

Hücrede süperoksit radikalleri tarafından meydana getirilen hasarın en iyi indikatörü lipid peroksidasyonu ve bunun sonucu membran lipidlerinde meydana gelen malondialdehide (MDA) yapısıdır. Hücre membranını meydana getiren çoklu doymamış fosfolipid yapıları süperoksit radikallerinin saldırısı sonucu içeren çift bağlar yerine MDA yapısı oluşur ve zincirleme oksidasyon reaksiyonu başlayarak membran boyunca otooksidasyon devam eder. Bunun sonucu olarak membran sertleşir, akışkanlığını yitirir ve kırılabilir bir hal alır. Bu sebeple hücre membranının hasarı hücre ölümüne ve bu ölümlerin artmasıyla yayılan doku hasarına neden olur (114). Membranda gerçekleşen otooksidasyonun sebebi bir çoklu doymamış yağ asidinde karbon merkezli oluşan radikallerin etrafında bulunan diğer çoklu doymamış yağ asitlerini de okside ederek radikal oluşumunu zincirleme devam ettirmesidir (115).

Membranı oluşturan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona uğraması ile birlikte membranda bulunan glikolipid, gliserid, steroller, oksidasyona

cevap verebilen amino asitlerden zengin membran proteinleri, glukoz ve nükleik baz içeren yapılarda da hasar meydana gelir. Membran lipidlerinde meydana gelen oksidasyon sonucu meydana gelen OH radikalleri diğer lipidlerde oksidasyonun başlamasına sebep olur. Reperfüzyonda meydana gelen radikal patlaması oksidasyon miktarını ve şiddetini arttıran en önemli faktördür (116). Bu reaksiyonlar nöronal hücreler dahil vasküler membran ve miyelinde de aynı şekilde hasarın meydana gelmesine neden olur.

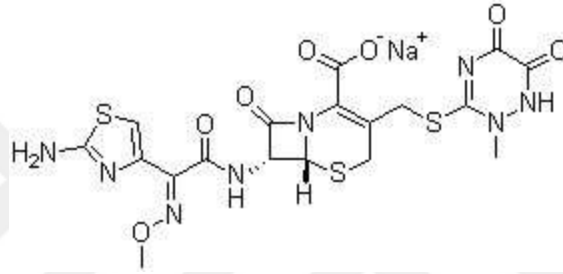
Malondialdehit biyokimyasal olarak hücre hasarının belirlenmesinde kabul edilen indikatörlerden en önemlilerinden biridir. MDA seviyesi hücrede meydana gelen hasarın şiddetiyle paralel şekilde artar (117). Lipid peroksidasyonu sonucu hücre membranı yanı sıra hücre içinde bulunan diğer yapılar oksidasyona uğrayarak yapı ve fonksiyonel bozulmaya uğrar. Böylelikle hücre membranı yanı sıra meydana gelen diğer hasarlar hücrenin ölümüne yol açar. Hücre ölümünün artması doku hasarının büyümesine ve o dokuda fonksiyon kaybının gelişmesine neden olur. Sonuç olarak hastalık semptomlarının gözlenmesi ve ilerleme hızında artma durumunun gerçekleşmesi lipid peroksidasyon şiddeti ve hızıyla paraleldir. Bu nedenle lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA miktarı hastalıkla direkt olarak ilişkilidir.

Lipid peroksidasyonu en çok hücre membranını hedef alması nedeniyle burada fonksiyon gören kanal, taşıyıcı proteinler ve sinyalizasyon komplekslerinin aktivitelerinde bozulma ortaya çıkar. Ayrıca DNA ile etkileşime giren radikaller mutasyonla birlikte hücre hayati fonksiyonların durmasına ve hatta kanser meydana gelmesine sebebiyet verebilirler (117).

2.10. Seftriakson

Seftriakson disodyum, geniş bir antimikrobiyal aktivite yelpazesine sahip üçüncü nesil yarı sentetik bir sefalosporin antibiyotiktir. B-laktamaz sentezleyen çoğu bakteri suşu dahil olmak üzere çoğu Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterinin çoğuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterir (118). Bakteri hücre duvarı sentezini bozarak transpeptidasyon evresinde penisilin bağlayan proteinleri (PBP) inhibe eder. Bakteri duvarı tam sentezlenemez ve iç basınçtan dolayı lize olur (119). Eksitatör

bir nörotransmitter olan glutamatın aşırı salınması, N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı derecede uyarabilir, bu da nöronlarda kalsiyum aşırı yüklenmesine ve apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesine neden olur. Sinaptik yarıktaki salınan glutamat glutamat taşıyıcı-1 (GLT-1) vasıtasıyla glial hücreler tarafından alınır, böylece sinapsda glutamat fonksiyonu sona erer. Glutamatın sinapstan artmış klirensi glutamat eksitotoksitesini önlemeye yardımcı olur. Bir beta-laktam antibiyotik olan seftriakson (CEF) GLT-1 ekspresyonunu ve salınmış glutamatın alınmasını artırır ve glutamat eksitotoksitesini iyileştirir ve nöronları eksitotoksik hücre ölümünden korumak için alternatif bir strateji olabilir (120).



Şekil 7. Seftriaksonun Kimyasal Yapısı

3. MATERYAL VE METOD

KTÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Tüm deney protokolleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulunun 2016/55 sayılı kararı ile). Biyokimyasal analizler Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Deneysel Hayvanları

Çalışmada her biri ortalama 220–280 g ağırlığında olan 38 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edilmiş su ve yem kısıtlaması olmaksızın standart koşullar altında ve ayrı ayrı kafeslerde izlendiler ve her sıçan yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlenmiştir.

3.2. Gruplar

Sıçanlar 4 ana gruba ayrıldı.

Grup 1 (Seftriakson): 12 sıçandan oluşan bu gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi + hipotansiyon yapıldıktan sonra her gün seftiakson 200 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal verildi. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

Grup 2 (İskemi): 12 sıçandan oluşan bu gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi+hipotansiyon oluşturuldu. Post-op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

Grup 3 (Sham=Kontrol): 7 sıçandan oluşan bu gruba sadece anestezi uygulandı ve 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.gün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

GRUP 4 (Pür Kontrol Grup): 7 sıçandan oluşan bu gruba anestezi sonrası cilt laserasyonu yapıldı ve her gün seftriakson 200 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal verildi. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

3.3. Metod

Seftriakson Grubundaki (Grup 1): Sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; ratlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer) 30mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®; Adeka) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi sonrası ekartör yerleştirildi.

Bilateral paratrakeal alanlar künt disseksiyonla disseke edildi. A.carotis kommunisler ortaya konuldu (Resim 1).



Resim 1. Supine Pozisyonunda Paratrakeal Alanların Disseksiyonu

Carotis Communisler N.vagustan ayrıldıktan sonra yaşargil anevrizma klibi yerleştirildi (Resim 2).



Resim 2. Sol A. Carotis Communise Yaşargil Klipi Yerleştirilmesi

Bilateral A.Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klipi yerleştirildikten sonra 30 dk beklenildi (Resim 3). Bu sırada intrakardiyak yaklaşık 3cc (10ml/kg) kan alınıp hipotansiyon yaratıldı. 30 dk sonunda klip çıkarıldıktan sonra arterial akım gözden geçirildi.



Resim 3. Bilateral A. Carotis Communis'lere Yaşargil Anevrizma Klipi Yerleştirilmesi

30 dk sonunda klipler çıkarıldı ve katlar usulüne uygun suture edildi (Resim 4).



Resim 4: Sütüre Edilmesi

Sıçanlar ayrı ayrı numarandırılmış besin ve suya kolayca ulaşabilecekleri kafeslere yerleştirildi (Resim 5).



Resim 5: Sıçanların Ayrı Ayrı Yerleştirilmesi



Resim 6. Sıçanlar Besin ve Suya Ulaşabileceği Ayrı Ayrı Yaşam Alanları

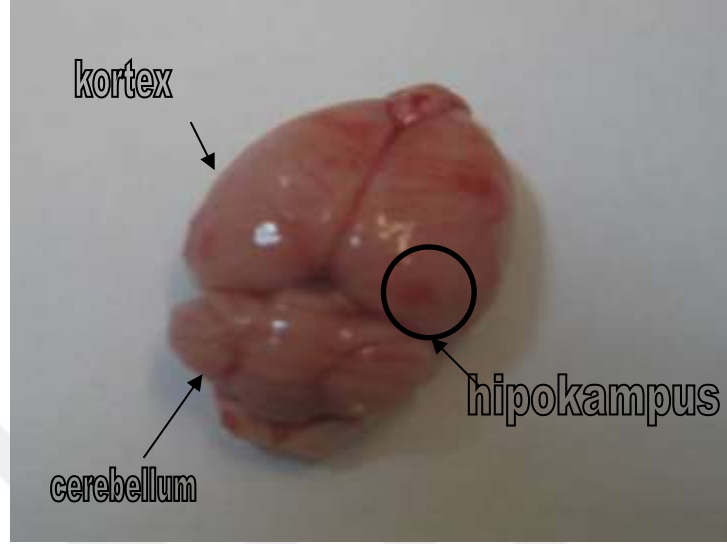
Sıçanlar 1, 4, 7 ve 10.günlerde nörolojik muayeneleri yapıldı. 10 gün boyunca 200 mg/kg/gün dozunda seftriakson hazırlanarak intraperitoneal olarak enjekte edildi.

10 gün sonra sağ kalan 10 sıçandan intrakardiyak 4cc kan alındı ve sakrifiye edilip beyinleri çıkarıldı (Resim 7).



Resim 7. Sakrifiye Edilen Ratların Beyin Dokusunun Çıkarılması

Beynin hipokampus, c. striatum, corpus kallozum ve talamus kısmı ayrıldı (Resim 8). Biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C 'de saklandı.



Resim 8. Beynin Hipokampus, C. Striatum, Corpus Kallozum ve Talamus Kısımlarının Ayrılması

İskemi grubundaki sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; sıçanlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer) 30mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi sonrası ekartör yerleştirildi. Bilateral paratrakeal alanlar künt disseksiyonla disseke edildi. A. carotis kommunisler ortaya konuldu. Bilateral A. Carotis Communisler N. vagustan ayrıldıktan sonra Yaşargil anevrizma klipi yerleştirildi. Bu sırada intrakardiyak 3cc (10ml/kg) kan alınıp hipotansiyon yaratıldı. 30 dk sonunda klip çıkarıldıktan sonra arterial akım gözden geçirildi. Arterial akımın varlığı teyid edilip katlar usulüne uygun kapatıldı. Post op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı.10. gün sonunda intrakardiyak 4cc kan alındı ve sakrifiye edilip beyinleri çıkarıldı. Beynin hipokampus, c.striatum, corpus kallozum ve talamus kısmı ayrıldı. Biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C 'de saklandı.

Pür kontrol grubundaki sıçanlar ameliyat öncesi 24 saat süre ile aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Anestezi sağlamak amacıyla; sıçanlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®) 30 mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Anestezi uygulanan sıçanlar, sırtüstü pozisyonda iken, cerrahi uygulanacak bölge traş edildi ve % 10'luk povidon iyot solüsyonu (Batticon®) ile boyandı. Orta hat cilt kesisi yapıldı ve daha sonra suture edildi ve her gün seftriakson 200 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal verildi. Post op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı.10 gün sonra intrakardiyak 4 cc kan alındıktan sonra sakrifiye edildi. Beynin hipokampus, c.striatum, corpus callosum ve talamus kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76 °C'de saklandı.

Sham (Kontrol) grubundaki sıçanlara anestezi sağlamak amacıyla; sıçanlara xylazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare) 10mg/kg dan intraperitoneal ve ketamin hidroklorid (Ketalar®) 30 mg/kg dan intraperitoneal olarak yapıldı. Post op 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10. gün sonunda intrakardiyak 4 cc kan sitratlı tüplere alınıp sakrifiye edildi. Beynin hipokampus, c. striatum, corpus callosum ve talamus kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C'de saklandı.

Tüm gruplara postop 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda (sakrifiye edilmeden hemen önce) motor muayene yapıldı.

Beyinde oluşacak değişiklikler biyokimyasal olarak hem kan hem de dokuda malonaldehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesiyle değerlendirildi.

3.4. Malondialdehit Tayini

3.4.1. Dokuda Malondialdehit Tayini

Mihara ve Uchiyama yöntemi modifikasyonu ile yapıldı. Metod, asidik ortamda MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yaptığı molekülün renginin 532 nm'deki absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır.

3.4.2. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH: 7.4): 10 adet PBS tableti (Medicago, Uppsala, Sweden) içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözülüp, çözeltinin pH'sı, 7.4 olarak pH metrede (Hanna Instrument, USA) ayarlandı. Son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

2. % 1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H₃PO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA) alınarak son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3. TBA çözeltisi: 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edildi ve magnetik bar ile karıştırılarak çözüldü.

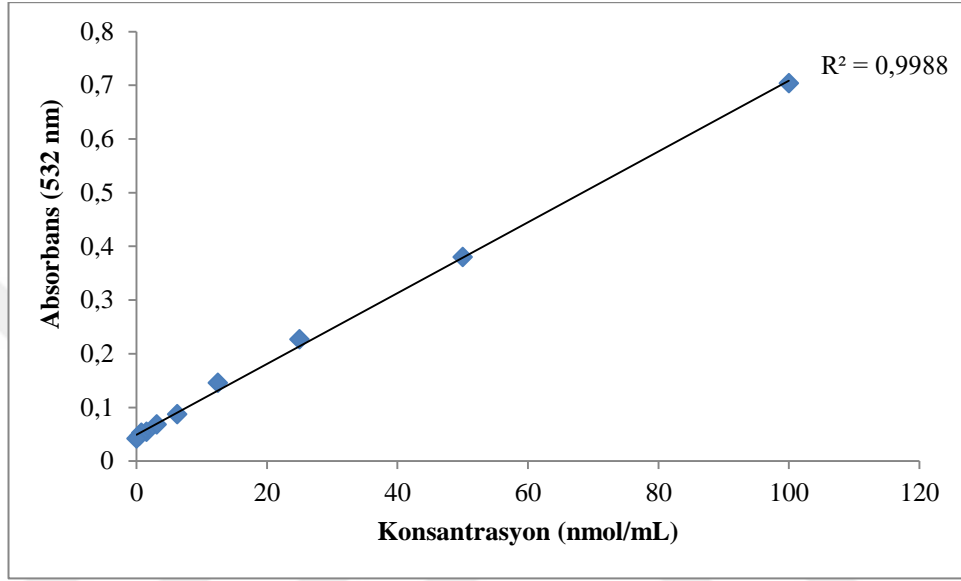
4. Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksiopropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 ve 0.195 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

Örneklerin Hazırlanışı: Dokuların her birinden yaklaşık 50'şer mg'lık kesimler yapıldı. Bu dokular 2 mL PBS içerisinde 9500 rpm (4x10s, 40°C)'de homejenizatör (Jane and Kunkel, Germany) ile homejenize edildi. Homejenatlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucudaki süpernatantlar 1:10 oranında PBS ile seyreltilip MDA ölçümü gerçekleştirildi.

3.4.3. Doku MDA Ölçümü

1. 500 µL homojenata 3 mL % 1'lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı.
2. Karışıma 1 mL % 0.672'lik TBA eklendi karıştırıldıktan sonra kaynar su banyosunda 60 dakika inkübe edildi.
3. 60 dakika sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonucu süpernatant kısımlardan 200'er µL alınıp 96 kuyucuklu pleytlere yüklenerek mikroyu okuyucu spektrofotometrede (Versamax,

Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu. Elde edilen standart absorban sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak doku MDA miktarı nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı (Şekil 8).



Şekil 8. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

3.4.4. Plazmada Malondialdehit Tayini

-80°C'de biyokimyasal analizler yapılana kadar Rat serum örnekleri saklandı. Yağı tarafından geliştirilen Tiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) metodu kullanılarak serum örneklerindeki malondialdehit miktarı tayin edildi (121). Spektrofotometrik olarak lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk ölçüldü. Tiyobarbitürikasit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

3.4.5. Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. **0.084 N Sülfürik Asit (H₂SO₄):** 577 µL % 97'lik H₂SO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA)'den alınıp, hacim deiyonize su ile 250 mL'ye tamamlandı.

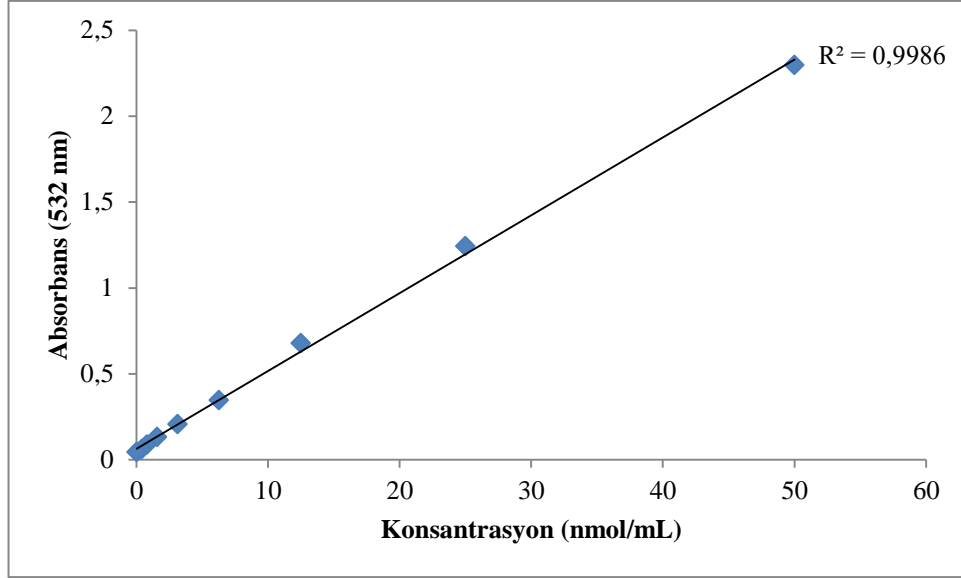
2. **% 10'luk Fosfotungstik Asit (H₃(W₃O₁₀).4H₂O):** 5.55 g fosfotungstik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 mL deiyonize suda çözüldü.

3. **Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi:** 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek magnetik bar ile karıştırılıp çözüldü.

4. **Standart çözeltiler:** 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksiopropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine ilave edildi. 1 saat çözelti 50°C'de inkübe edildi. Hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 ve 0.195 nmol/mL'lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

3.4.6. Serum MDA Ölçümü

1. Deney tüplerine 150'şer µL serum, 1200'er µL H₂SO₄ ve 150'şer µL fosfotungstik asit eklendi, tüpler karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
2. Karışımlar 1500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst fazlar atıldı.
3. Çökelek kısımları üzerine 2'şer mL saf su eklenip yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Tüplere 500'er µL TBA eklendi ve 1 saat 100°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından tüpler 10 dakika 1000 g'de santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısımlardan 200'er µL alınarak 96 kuyucuklu pleytlere yüklenerek mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak serum MDA miktarı nmol/mL olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9. Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Standart Grafiği

3.5. Motor Muayene

Sıçanların her gün Bederson skalasına göre motor muayene skor ortalamaları sunulmuştur Tablo 2’de sunulmuştur. Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerde motor skorları Tablo 2’e göre puanlaması yapılmıştır.

Tablo 2. Bederson Skalası

Grade 0	Nörolojik defisit yok	5 puan
Grade 1	Ön bacaklarda fleksiyon	4 puan
Grade 2	Dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç	3 puan
Grade 3	Grade 2’ye ilave olarak dönme hareketinin eklenmesi.	2 puan
Grade 4	Exitus	1 puan

Sıçanların deneysel beyin iskemi-reperfüzyon yaralanması deneylerinin takip parametreleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Deneysel Beyin İskemi Reperfüzyon Yaralanmasında Takip Parametreleri

Klinik ve nörolojik muayene Bederson motor scalası
Histolojik muayene Nöron sayımı, infarkt volümü ölçümü
Görüntüleme Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme
Angiografik değerlendirme
Aksonal tarayıcılar ile değerlendirme
Biyokimyasal ölçümlerle değerlendirme Malondialdehit, Myeloperoksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vs
Nörofizyolojik değerlendirme Uyarılmış potansiyeller, EEG

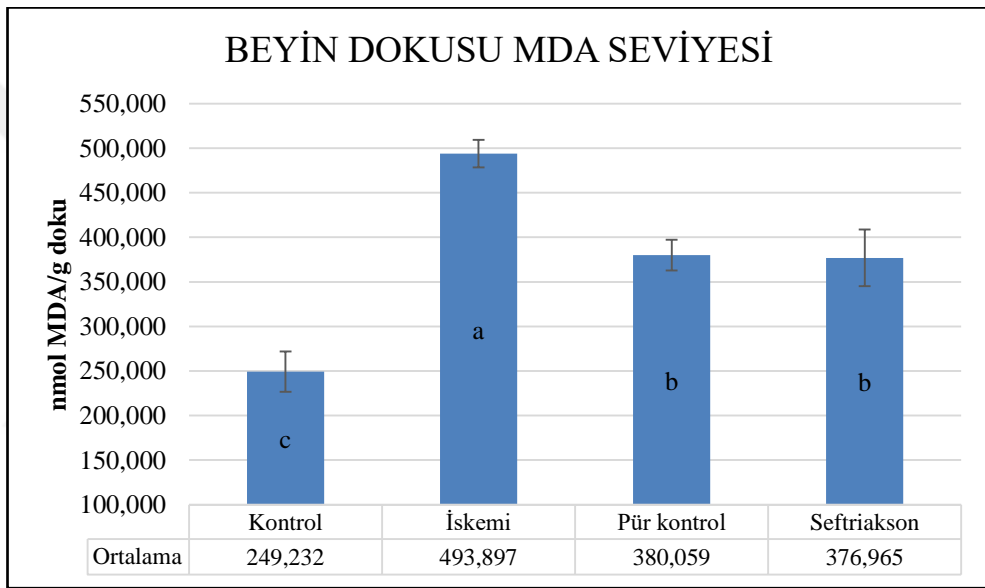
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22,0 paket programı kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

İstatistik analizler IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlenmiş ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi uygulanmıştır.

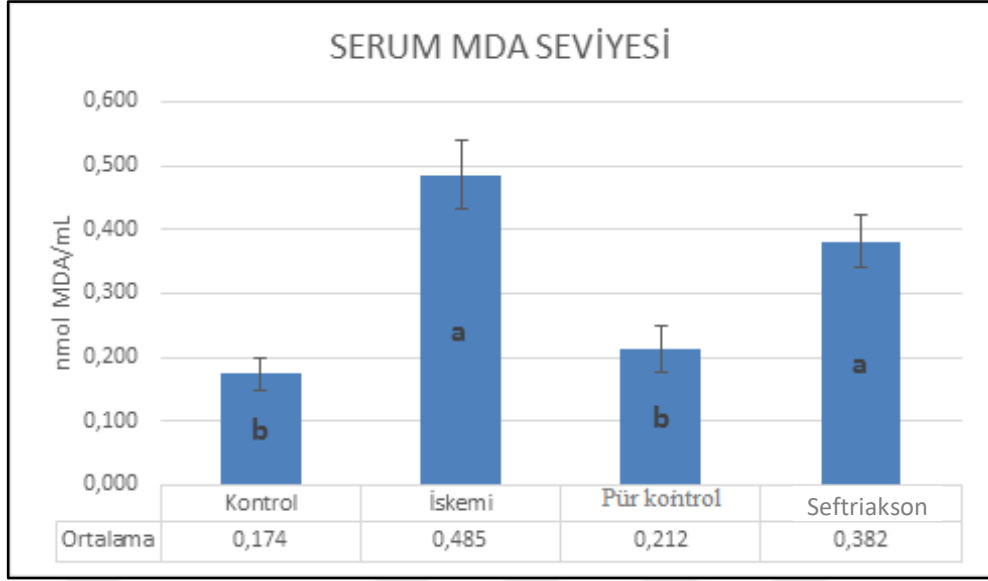
4. BULGULAR

Beyin dokusundaki MDA seviyesi kontrol grubu ve iskemi grubu ile kıyaslandığında doku MDA seviyesini önemli miktarda arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Pür kontrol ve seftriakson gruplarının MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0.05$), iskemi grubu ile kıyaslandığında seftriakson uygulamasının anlamlı şekilde doku MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10. Doku MDA Ortalamaları

Serum MDA seviyesi iskemi grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). İskemide uygulanan seftriaksonun serum MDA seviyesinde belirgin bir düşüş sağlayamadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 11).



Şekil 11. Serum MDA Ortalamaları

Tablo 4. Grupların Bederson Motor Skalasına Göre 1., 4., 7. ve 10. Günlerdeki Skorları

GRUPLAR/GÜN	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	10.GÜN
SEFTİRİAKSON	4	4	5	5
	4	4	4	5
	3	3	3	4
	2	3	4	5
	2	3	3	4
	3	3	2	2
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	3	4	4	4
	2	3	3	4
	4	3	4	4
	2	3	3	3
İSKEMİ	2	2	2	2
	1	1	1	1
	1	1	1	1
	2	2	2	2
	2	2	2	3
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	5	5	5	5
	2	2	3	3
	2	2	2	2
	2	3	3	3
	2	2	2	2
SHAM=KONTROL	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	4	5	5	5
PÜR KONTROL	3	4	5	5
	4	5	5	5
	5	5	5	5
	4	5	5	5
	5	5	5	5
	3	4	4	5
	5	5	5	5

Tablo 5. Grupların Bederson Motor Skalasına Göre 1., 4., 7. ve 10. Günlerdeki Skorları Median ve Min-Max Değerleri

GRUP	1. GÜN		4. GÜN		7.GÜN		10.GÜN	
	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.	Med.	Min-Max.
Seftiakson	2.66	2-5	3	2-5	3.33	2-5	3.75	2-5
İskemi	2.83	2-5	3.16	2-5	3.08	2-5	3.16	2-5
Sham	4.42	1-5	4.42	1-5	4.42	1-5	4.42	1-5
Pür Kontrol	3.85	3-5	4.71	4-5	5	5-5	5	5-5

5. TARTIŞMA

İskemi, arteriyel veya venöz kan akımının azalmasına, tıkanmasına, damar dışına kanamalar nedeniyle dokunun oksijensiz kalması, hücre içi enerji depolarının bitmesi ve toksik metabolit oluşmasıyla hücre ölümüne gitmesi hali olup, reperfüzyonu durumunda ise hücre içine moleküler oksijen girişiyle oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) nedeniyle iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açması halidir (1-3). Dünya Sağlık Örgütü'ne(WHO) göre inme; Vasküler nedenler haricinde her hangi bir sebep yokken global veya fokal beyin fonksiyonuna yönelik belirtilerin ve bulguların hızla kaybı ile karakterize, mortalite ile sonuçlana bilen ya da işlev kaybının 24 saati geçebildiği klinik sendromdur (6). Serbral iskemisi dünyada ki sakatlık ve ölümlerin en yaygın nedenlerinden biri olup (7). Vakalarının %80-85'i iskemik, %15-20'si hemorajik sebeplerdedir ve her yıl ABD'de de 700.000 yeni stroke vakası olmakta ve %20'si yıl içerisinde ölmektedir (7-12).

Hipokrat (M.Ö 460-370) döneminden beridir mortalite, morbidite, ekonomik ve psikososyal kayıpları nedeniyle çok sayıda çalışma, deneysel modeli bulunan iskemik inmenin daha iyi anlaşılabilmesi, serbral hasarın geriye döndürülebilmesi, tedavi modellerinin oluşturulabilmesi açısından birçok çalışma yapılmış fakat halen kabul görmüş net bir tedavi bulunmamaktadır.

Patofizyolojinin anlaşılabilmesi ve tedavi modellerinin oluşturulabilmesi açısından birçok yöntem denenmiş olup yaygın olarak tercih edilen iki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon ve eş zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 30-35 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapıp sonrasında sonrası klipsler kaldırılarak reperfüzyon yapılan yöntem çalışmamızda da kullanılmıştır (54).

Çalışmamızda iki taraflı karotis kliplmesi + hipotansiyon modelini uygulayarak beyinde iskemi–reperfüzyon injürisi yaratarak beyin omurilik sıvısına geçişi de olan cerrahi profilaksi tercihlerinden biri olan ve önceki çalışmalarda nöroprotektif etkisi gösterilen seftriakson antibiotiğini kullandık.

Serebrovasküler iskemiye takiben eksitotoksisite, asid-baz dengesizliği, iyon dengesizliği, peri-enfarktüs depolarizasyon, oksidatif ve nitratif stres, enflamasyon, apopitozisi içeren birden çok karmaşık yolağın etkileşimi sonucu hasar oluşmaktadır (25). Adenosin 5'-trifosfat (ATP) üretiminin ve Na + / K + taşıyıcısının

bozulmasından sonra, hücre depolarizasyon, intrinsek apoptoz yolağının ve hücre ölümünün aktivasyonu ile sonuçlanan Ca^{2+} akışını sağlar (28). Hücre dışı alanda glutamat birikmesi, N-metil-D-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonat (AMPA) ve Ca^{2+} akışına aracılık eden kainat glutamat reseptörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (29). Artmış oksidatif stres, inme sırasında enerji bağımlı süpürücü enzimlerin azaltılması ile birlikte süperoksit, hidroksil radikali, nitrik oksit ve peroksinitrit ile serbest radikal oluşumu ortaya çıkar (30). Serbest radikal üretimi, aynı zaman araziidonik asit metabolizması, periferik lökositlerin infiltrasyonu ve mikroglia ve monositlerin neden olduğu indüklenbilir nitrik oksit sentazının upregülasyonundan da oluşur ve tümü akut inme sırasında görülür (31-33). Serbest radikaller ve Ca^{2+} , inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin yanı sıra endotel hücre adezyon molekülleri ve proinflamatuvar genleri indükler (34-36).

Serbest radikaller ayrıca lipid peroksidasyonu, apoptozid indüksiyonu ile sonuçlanır ve Na^{+} / K^{+} ATPaz, glukoz ve glutamat taşıyıcılarını kovalent olarak modifiye eden 4-hidroksinonenal üretimini etkiler (37). Endotel değişiklikleri aynı zamanda kan beyinde bariyer disfonksiyonu ve artmış inflamatuvar cevap ile sonuçlanabilir (41). İskemik inmeden sonra artmış serebral ödem, hasta prognozunun kötüleşmesinde de rol oynar (46).

Kısaca eksitotoksisite, asid-baz dengesizliği, iyon dengesizliği, peri-enfarktüs depolarizasyon, oksidatif ve nitratif stres, enflamasyon, apoptozisi içeren birden çok karmaşık kaskad sonucunda iskemide eksitator bir nörotransmitter olan glutamatın aşırı salınması, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı derecede uyarabilir, bu da nöronlarda kalsiyum aşırı yüklenmesine ve apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesine neden olur. Sinaptik yarıktaki salınan glutamat glutamat taşıyıcı-1 (GLT-1) vasıtasıyla glial hücreler tarafından alınır, böylece sinapsda glutamat fonksiyonu sona erer. Glutamatın sinapstan artmış klirensi glutamat eksitotoksisitesini önlemeye yardımcı olur. Bir beta-laktam antibiyotik olan Ceftriaxone (CEF) GLT-1 ekspresyonunu ve salınmış glutamatın alınmasını artırır ve glutamat eksitotoksisitesini iyileştirir ve nöronları eksitotoksik hücre ölümünden korumak için alternatif bir strateji olabilir (25, 120). Beyin dokusunda ve serumdaki MDA değerleri ölçülerek çalışmamız yapılmıştır.

Beyin dokusundaki MDA seviyesi kontrol grubu ve iskemi grubu ile kıyaslandığında doku MDA seviyesini önemli miktarda arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Sham ve seftriakson gruplarının MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0.05$), iskemi grubu ile kıyaslandığında seftriakson uygulamasının anlamlı şekilde doku MDA seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Serum MDA seviyesi iskemi grubunun kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). İskemide uygulanan seftriaksonun serum MDA seviyesinde belirgin bir düşüş sağlayamadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Burada seftriaksonun kesinlikle antioksidan bir özelliğinin bulunmamasının yanı sıra iskemi uygulamasının kanda meydana getirdiği etkiyi de azaltmadığı görülüyor. Muhtemelen kan dokusunun antioksidan kapasitesinin diğer dokulara nazaran zayıf olmasından dolayı bu etkilenme normal görülebilir. Kan dokusunun antioksidan kapasitesinin zayıflığı eritrositlerde mitokondrial aktivite olmaması sebebiyle düşük seviyede savunma ajanı ihtiva etmesi, endotel etrafında seyreden nitrik oksit (NO) aktivitesi gibi oksidatif seyreden aktivitelerin devamlı bir süperoksit kaynağı oluşturabilmesi, diğer dokularda meydana gelen etkileri de yansıması gibi nedenlerden kaynaklanmakta. Aslında serum MDA seviyesi vücutta meydana gelen genel bir oksidatif stresi de gösterir. Serum MDA seviyesinin sadece iskemiye spesifik olmadığı sonucunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Ratların deneysel beyin iskemi ve reperfüzyon injurisinde seftriaksonun etkileri adlı çalışmamızda; Bilateral karotid arterler kliplenerek ve intrakraniyal kan alınması ile hipotansiyon oluşturulup klip çıkarılarak ratlarda serebral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturuldu. İstatiksel olarak da serebral iskemi oluşturuldu. Bederson nörolojik muayene skalasına göre gruplar arasında, değişik derecelerde nörolojik hasar oluşturuldu. Seftriaksonun antioksidan bir özelliğinin bulunmamasının ve oksidatif stres sebeplerinden biri olmasının yanı sıra iskemi uygulamasının kanda meydana getirdiği etkiyi de azaltmadığı görülüyor. Kan dokusunun antioksidan kapasitesinin diğer dokulara nazaran zayıf olmasından dolayı bu etkilenme normal görülebilir. Kan dokusunun antioksidan kapasitesinin zayıflığı eritrositlerde mitokondrial aktivite olmaması sebebiyle düşük seviyede savunma ajanı ihtiva etmesi, endotel etrafında seyreden nitrik oksit (NO) aktivitesi gibi oksidatif seyreden aktivitelerin devamlı bir süperoksit kaynağı oluşturabilmesi, diğer dokularda meydana gelen etkileri de yansıtması gibi nedenlerden kaynaklanmakta. Aslında serum MDA seviyesi vücutta meydana gelen genel bir oksidatif stresi de gösterir. Spesifik olmadığından değişimleri sadece iskemiye bağlamanın doğru olmadığını düşünmekteyim.

Sonuçta, serebral iskemi ve reperfüzyon hasarlanmasında seftriaksonun serebral dokuda nöroprotektif etkinliğinin olduğu çalışmamızda gösterildi.

7. KAYNAKLAR

1. Şener G, Yeğen BÇ (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22.3: 5-14.
2. Wilhelm J (1990). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Medica. Monographia* 137:1-53.
3. Zimmerman BJ, Granger DN (1992). Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* 72.1: 65-83.
4. Cimarosti H, Henley JM (2008). Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: potential involvement of protein SUMOylation. *The Neuroscientist*, 14(6), 626-636.
5. Harukuni I, Bhardwaj A (2006). Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurologic clinics*, 24(1), 1-21.
6. Sudlow CLM, Warlow CP (1996). Comparing stroke incidence worldwide: what makes studies comparable?. *Stroke*, 27(3), 550-558.
7. Liu XQ, Sheng R, Qin ZH (2009). The neuro protective mechanism of brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(8), 1071.
8. Ropper AH, Brown RH (2006). Serebrovasküler hastalıklar. Çeviren: Çoban O, Bebek N, eds. 8. baskı, Ankara: Güneş Kitapevi
9. Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Binney LE (2005). Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *The Lancet*, 366 (9499), 1773-1783.
10. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, Rockwood K (2003). Vascular cognitive impairment. *The Lancet Neurology*, 2(2), 89-98.
11. American Heart Association. (2005). Know the Facts, Get the Stats: Our Guide to Heart Disease, Stroke and Risks. *Dallas, TX: American Heart Association*.
12. Heart disease and stroke statistics. (2017) update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 135(10), e146.
13. Prencipe M, Culasso F, Rasura M, Anzini A, Beccia M, Cao M, Fieschi C (1998). Long-term prognosis after a minor stroke: 10-year mortality and major stroke recurrence rates in a hospital-based cohort. *Stroke*, 29(1), 126-132.
14. Bradley WG (2004). *Neurology in Clinical Practice Third Edition, Ischemic Cerebrovascular Disease*, Butterworth-Heinemann, 1125-1166

15. Yemişçi M, Gürer G, Dalkara T (2004). İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology*, 2(1), 22-30.
16. Hall ED (1992). The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *Journal of neurosurgery*, 76(1), 13-22.
17. Eklöf B, Siesjö BK (1972). The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, 86(2), 155-165.
18. Karaman İ (2013). Seftriaksonun uzaysal bellek üzerine etkisinde GLT-1 transporter aktivasyonunun rolü.
19. Yang YC, Liu BS, Shen CC, Lin CH, Chiao MT, Cheng HC (2011). Transplantation of adipose tissue-derived stem cells for treatment of focal cerebral ischemia. *Current Neurovascular Research*, 8(1), 1-13.
20. Mazzoni P (2003). Merritt's Nöroloji El Kitabı. *Ankara: Güneş Kitabevi*, 121-155.
21. Winn HR (2003). *Youmans neurological surgery*. Elsevier Saunders, Book Section XII Vascular
22. Anderson WAD, Kissane JM, Anderson Patoloji Çeviren: Kaancıgil A, Güven Yayınları, 1982, 262-267.
23. Mari C, Karabiyikoglu M, Goris ML, Tait JF, Yenari MA, Blankenberg FG (2004). Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rodent model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 31(5), 733-739.
24. Mehta SL, Manhas N, Raghbir R (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews*, 54(1), 34-66.
25. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310-318.
26. Karsy M, Brock A, Guan J, Taussky P, Kalani MYS, Park MS (2017). Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurgical focus*, 42(4), E3.
27. Smith WS (2004). Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *Journal of vascular and interventional radiology*, 15(1), 3-12.
28. Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*, 79(4), 1431-1568.

29. Lipton SA, Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 613-622.
30. Love S (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain pathology*, 9(1), 119-131.
31. Hall ED (1995). Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *Journal of the neurological sciences*, 134, 79-83.
32. Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in neurobiology*, 56(2), 149-171.
33. Wei Y, Yemisci M, Kim HH, Yung LM, Shin HK, Hwang SK, Liao JK (2011). Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia. *Annals of neurology*, 69(1), 119-129.
34. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, 22(9), 391-397.
35. Ishida K, Berger M, Nadler J, S Warner D. (2014). Anesthetic neuroprotection: antecedents and an appraisal of preclinical and clinical data quality. *Current pharmaceutical design*, 20(36), 5751-5765.
36. Willmot M, Gray L, Gibson C, Murphy S, Bath PM (2005). A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. *Nitric Oxide*, 12(3), 141-149.
37. Mattson MP (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental gerontology*, 44(10), 625-633.
38. Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, Koziol JA (2007). Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*, 38(2), 646-651.
39. O'Bryant Z, Vann KT, Xiong ZG (2014). Translational strategies for neuroprotection in ischemic stroke-focusing on acid-sensing ion channel 1a. *Translational stroke research*, 5(1), 59-68.
40. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004). Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic brain disease*, 19(3-4), 151-167.
41. Davis SM, Albers GW, Diener HC, Lees ER, Norris J (1997). Termination of acute stroke studies involving selfotel treatment. *The Lancet*, 349(9044), 32.
42. Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP (2005). Stroke and T-cells. *Neuromolecular medicine*, 7(3), 229-242.

43. Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Magnus T (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40(5), 1849-1857.
44. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J (1997). The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatric research*, 41(5), 607.
45. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K (1994). Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*, 25(7), 1469-1475.
46. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM (2016). Molecular pathophysiology of cerebral edema. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(3), 513-538.
47. Aronowski J, Zhao X (2011). Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke*, STROKEAHA-110.
48. Pound P, Bury M, Ebrahim S (1997). From apoplexy to stroke. *Age and ageing*, 26(5), 331-337.
49. Schiller F (1970). Concepts of stroke before and after Virchow. *Medical history*, 14(2), 115-131.
50. Toole JF (2010). A History of cerebrovascular Disease since the Renaissance. *Toole's Cerebrovascular Disorders*.
51. Schutta HS (2009). Morgagni on apoplexy in De Sedibus: a historical perspective. *Journal of the History of the Neurosciences*, 18(1), 1-24.
52. Block F (1999). Global ischemia and behavioural deficits. *Progress in neurobiology*, 58(3), 279-295.
53. Pulsinelli WA, Brierley JB (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3), 267-272.
54. Pulsinelli WA, Buchan AM (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 19(7), 913-914.
55. Kirino T (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain research*, 239(1), 57-69.
56. Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA (1990). Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 10(4), 550-556.

57. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *stroke*, 17(3), 472-476.
58. Zwiebel WJ, Pellerito JS, Mihmanlı İ (2006). *Vasküler ultrasona giriş*. İstanbul Medikal Yayıncılık.
59. Ökten Aİ, Güzel A (2012). Beynin Arteriyel Anatomisi. *Nöroşirürji Dergisi* Cilt: 22, Sayı: 3, 171-188
60. Keller JT, van Loveren HR, Sepahi AN, Zuccarello M (2002). Internal carotid artery: correlative anatomy as a guide to surgery. In : *International Congress Series* (Vol. 1247, pp. 3-18).
61. Yasargil MG (1984). Carotid-posterior communicating aneurysms. *Microneurosurgery II*, 1984, 71-90.
62. Ziyal İ (2007). Cerrahi Nöroanatomî Disseksiyon Atlası. *Ankara: Hacettepe Üniversitesi*, 23-88.
63. Fujii K, Lenkey C, Rhoton Jr AL (1980). Microsurgical anatomy of the choroidal arteries: Lateral and third ventricles. *Journal of neurosurgery*, 52(2), 165-188.
64. Harris FS, Rhoton Jr AL (1976). Anatomy of the cavernous sinus: a microsurgical study. *Journal of neurosurgery*, 45(2), 169-180.
65. Rhoton Jr AL (2003). *Cranial Anatomy and Surgical Approaches*. Philadelphia Lippincott: Williams&Wilkins, 81-84
66. Gibo H, Carver CC, Rhoton Jr AL, Lenkey C, Mitchell RJ (1981). Microsurgical anatomy of the middle cerebral artery. *Journal of neurosurgery*, 54(2), 151-169.
67. Rhoton Jr AL (2003). *Cranial Anatomy and Surgical Approaches*. Philadelphia Lippincott: Williams&Wilkins, 96-110
68. Sarıoğlu AÇ (1995) *Temel Nöroşirürji*. Cilt I. Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği. 479-487
69. Yaşargil MG (1984). *Microneurosurgery*. Volum I. Stutgart, New York: Georg Thieme Verlag, 72-91
70. Yaşargil MG (1984). *Microneurosurgery*. Volum I. Stutgart, New York: Georg Thieme Verlag, 128-143
71. Balkan S (2005). *Serebrovasküler Hastalıklar*. Serebrovasküler anatomi. *Ankara: Güneş Tıp Kitabevi*, 289-313.

72. Winn HR (2003). *Youmans neurological surgery*. Elsevier Saunders, Book Chapter 6, Neurons and Neuroglia
73. Ross MH, Pawlina W, Histology A (2006). A text and atlas with correlated cell and molecular biology.
74. Junqueira LC, Carneiro J (2006). *Sinir Dokusu ve Sinir Sistemi* (Ed: AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S). Bölüm 12 , Williams & Wilkins.
75. Paker Ş (1993). *Histoloji*. 2. Baskı Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990;187-203, 439-444
76. Snell RS (2000). *Klinik Nöroanatomisi*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 48299
77. Eşrefoğlu M (2016) *Genel Histoloji*. 2. Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul
78. Insausti R, Amaral DG (2012). *The Human Nervous System: Hippocampal formation*. 3th ed. 896-942
79. İzci Y, Erbaş YC (2015). Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir. Derg.*, 25(3), 287-95.
80. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M (2001). Hipokampus. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 21(5), 427-431.
81. Clarke PG (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology*, 181(3), 195-213.
82. Hadhazy P, Szerb JC (1977). The effect of cholinergic drugs on [3H] acetylcholine release from slices of rat hippocampus, striatum and cortex. *Brain Research*, 123(2), 311-322
83. Sadler TW (1990). *Langman's medical embryology*. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Press, 356
84. Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.
85. Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Kurachi M (2004). Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cerebral Cortex*, 15(2), 187-193.
86. Tien RD, Felsberg GJ, Crain B (1992). Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *AJR. American journal of roentgenology*, 159(6), 1309-1313.

87. Erdem A, Yaşargil MG, Roth P (1993). Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. *Journal of neurosurgery*, 79(2), 256-265.
88. Tatu L, Vuillier F (2014). Structure and vascularization of the human hippocampus. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 18-25). Karger Publishers.
89. Svensson LG, Crawford ES, Sun J (1997). Ischemia, reperfusion, and no-reflow phenomenon. *Cardiovascular and vascular disease of the aorta. Philadelphia: WB Saunders Co*, 194-218.
90. Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K (1988). Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Critical care medicine*, 16(7), 714-726.
91. Ransom BR, Walz W, Davis PK, Carlini WG (1992). Anoxia-induced changes in extracellular K⁺ and pH in mammalian central white matter. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 12(4), 593-602.
92. Choi DW, Rothman SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*, 13(1), 171-182.
93. Choi DW (1988). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in neurosciences*, 11(10), 465-469.
94. Liang D, Dawson TM, Dawson VL (2004). What have genetically engineered mice taught us about ischemic injury?. *Current molecular medicine*, 4(2), 207-225.
95. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*, 4(2), 193-205.
96. Akins PT, Atkinson RP (2002). Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Current medical research and opinion*, 18(sup2), s9-s13.
97. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain research bulletin*, 46(4), 281-309.
98. Kristián T, Siesjö BK (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29(3), 705-718.
99. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W (1987). Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proceedings of the Nutrition Society*, 46(1), 1-12.

100. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), RA141-RA147.
101. Aisen P, Listowsky I (1980). Iron transport and storage proteins. *Annual review of biochemistry*, 49(1), 357-393.
102. Scott G (1988). Potential toxicological problems associated with antioxidants in plastics and rubber consumables. *Free radical research communications*, 5(3), 141-147.
103. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM (1980). Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(2), 1159-1163.
104. Frew JE, Jones P (1984). Structure and functional properties of peroxidases and catalases. *Advances in inorganic and bioinorganic mechanisms*, 3, 175-212.
105. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The lancet*, 344(8924), 721-724.
106. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(7), 693-702.
107. Austin GE, Lam L, Zaki SR, Chan WC, Hodge T, Hou JUNWEI, Whitsett C (1993). Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5'flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells. *Leukemia*, 7(9), 1445-1450.
108. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.
109. Jornot L, Petersen H, Junod AF (1998). Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemical Journal*, 335(1), 85-94.
110. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
111. Çakatay U, Kayalı R (2004). Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(3).
112. Klebanoff SJ (1990). Myeloperoxidase-occurrence and biological function. *Peroxidase in chemistry and biology*, 180-192.

113. Trush MA, Kensler TW (1991). An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3-4), 201-209.
114. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002). İnsan biyokimyası. 1th ed. *Palme yayıncılık*, 666.
115. Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201(4359), 875-880.
116. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U (2012). Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2012, 1(1), 52-58.
117. Machlin LJ, Bendich A (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
118. Zajac M, Jelińska A, Zalewski P (2005). Stability of ceftriaxone disodium in Biotrakson and Tartriakson. *Acta poloniae pharmaceutica*, 62(2), 89-94.
119. Tezgel T (2006). *Sefalosporin Formülasyon Atıksularının O₃ Ve O₃/h₂O₂ Prosesleri ile Ön Arıtılabilirliği* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
120. Tikhonova MA, Ho SC, Akopyan AA, Kolosova NG, Weng JC, Meng WY, Ho YJ (2017). Neuroprotective effects of ceftriaxone treatment on cognitive and neuronal deficits in a rat model of accelerated senescence. *Behavioural brain research*, 330, 8-16.
121. Yagi K (1984). [39] Assay for blood plasma or serum. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 328-331). Academic press.