

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**



**RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE RİFAMPİSİN'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Selim GEL

Trabzon-2017

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**



**RATLARIN DENEYSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON
İNJURİSİNDE RİFAMPİSİN'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Mehmet Selim GEL

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erhan ARSLAN

Trabzon-2017

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03/11/2017

Dr. Mehmet Selim GEL

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bana verdikleri desteklerinden ötürü Prof. Dr. Süleyman BAYKAL, Prof. Dr. Kayhan KUZEYLİ, Prof. Dr. Haydar USUL, Prof. Dr. Ertuğrul ÇAKIR, Doç. Dr. Erhan ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Uğur YAZAR ve diğer bölüm hocalarıma, deney aşamasında vermiş olduğu destekten ötürü Dr. Mehmet AKTOKLU ve diğer değerli mesai arkadaşlarıma, dua ve emeklerini üzerimden hiç eksik etmeyen aileme, destek ve sabırlarından dolayı teşekkür ederim.

Dr. Mehmet Selim GEL



ÖZET

RATLARIN DENEYSSEL BEYİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON İNJURİSİNDE RİFAMPİSİN'İN ETKİLERİ

Amaç: Bu çalışmada geçici beyin iskemisi oluşturulan sıçanlardaki iskemi üzerine rifampisin'in hipokampal bölgede malondialdehid düzeylerine ve nörolojik muayene üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda 220–280 g ağırlığında olan 38 adet spraque dawley sıçan deneye alındı. İki damar oklüzyon + hipotansiyon iskemi-reperfüzyon modeli uygulaması için, bilateral karotis arterler geçici olarak (30 dk) klemplenip intrakardiyak 3 cc kadar kan alındıktan sonra hipotansiyon yaratılmıştır. 30 dk sonunda klempler çıkarılıp reperfüzyon ortamı oluşturulmuştur. 12 sıçandan oluşan bir gruba 30 dk bilateral karotis kliplmesi + hipotansiyon (10ml/kg) yapıldıktan sonra her gün rifampisin 30mg/kg 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. 12 sıçandan oluşan diğer gruba 30 dk bilateral karotis kliplmesi+hipotansiyon (10ml/kg) 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. 7 rattan oluşan bir guruba sadece cilt laserasyonu yapıldı. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı. 7 rattan oluşan son gruba sadece 15 dakika anestezi verildi. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

Bulgular: Yapılan karşılaştırmada gruplar arasında doku MDA ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.112$). Gruplar arasında serum MDA ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.033$).

Sonuç: Bu çalışmada, rifampisin'in beyin iskemi-reperfüzyon injürisinde nöroprotektif etkisinin olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Malondialdehid, Rifampisin

SUMMARY

EFFECTS OF RIFAMPICIN ON EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN RATS

Purpose: In this study, we aimed to search the effect of rifampicin on malondialdehyd in hippocampal region and the neurologic findings at rats with artificially maintained transient brain ischemia.

Materials and Method: Total of 38 Spraque dawley rats weighing 220-280g were included in the study. In order to demonstrate two vessels occlusion+ hypotension ischemia-reperfusion model, bilateral carotid arteries are clamped temporarily (for 30m) and 3 cc blood was extracted from the heart to obtain hypotension. Reperfusion is established with the removal of the clamps. One group consisting of 12 rats received 30mg/kg/day rifampicin intraperitoneally subsequent to 30 minutes bilateral carotid occlusion+ hypotension (10ml/kg). Post operative first, fourth, seventh and tenth day neurologic examinations are done. At the tenth day the rats are sacrificed and brain tissues are extracted. Another group of seven rats had only skin laceration. First, fourth, seventh and tenth day neurologic examination are done. At the end of the tenth day these rats also sacrificed and their brain tissues are extracted. The last group of seven rats had only 15 minutes anesthesia. First, fourth, seventh and tenth day neurologic examination are done. At the end of the tenth day these rats also sacrificed and their brain tissues are extracted.

Findings: A statistically significant difference in terms of tissue MDA averages could not be established when all three groups are compared ($p=0,112$); However, serum MDA levels showed a statistically significant difference among groups ($p=0,033$).

Results: In this study, it is showed that rifampicin has a neuroprotective effect on ischemia-reperfusion injury.

Key words: Ischemia, Malondialdehyd, Rifampicin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

BEYAN

ÖNSÖZ..... iv

ÖZET..... ii

SUMMARY iii

İÇİNDEKİLER iv

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

TABLolar DİZİNİ vii

RESİMLER DİZİNİ viii

GRAFİKLER DİZİNİ ix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER..... 3

2.1. Tarihçe..... 7

2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi 9

2.3. Beyin Dokusu Histolojisi 12

2.3.1. Nöron 12

2.3.2. Glia hücreleri..... 13

2.4. Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik Ve Histolojik Özellikleri 14

2.5. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi 15

2.6. Glutamat Eksitotoksitesi Ve Kalsiyum Sitotoksitesi 17

2.7. Serbest Radikaller 19

2.8. Myeloperoksidaz (MPO)..... 22

2.9. Lipit Peroksidasyonu ve Malonaldehit (MDA)..... 23

2.10. Rifampisin 24

3. MATERYAL VE METOD..... 26

3.1. Deney Hayvanları..... 26

3.2. Gruplar 26

3.3. Metod 27

3.4. Malondialdehit Tayini 32

3.4.1. Dokuda Malondialdehit Tayini 32

3.4.2. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
3.4.3. Doku MDA Ölçümü.....	33
3.4.4. Plazmada malondialdehit tayini	34
3.4.5. Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.4.6. Serum MDA Ölçümü:	34
3.6. Motor Muayene.....	35
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	36
4. BULGULAR.....	37
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ.....	45
7. KAYNAKLAR	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: C: core alanı (beslenme: 10-12 ml/100g/dakika), P1: core'a en yakın alan (beslenme: 18 ml/100g/dakika) ve erken dönemde perfüzyonun düzelmemesi halinde doku kayıp riskinin olduğu alan, P2: İskemik risk altındaki penumbra alanı (perfüzyon yetersizdir fakat genellikle ölüm ile sonuçlanmaz), N: Normal parankim (penumbra dışı alan).....	4
Şekil 2: Serebral fokal iskeminin zamansal görünümü.....	5
Şekil 3: Willis poligonu	10
Şekil 4: Ratlarda arteriel dolaşım.....	100
Şekil 5: İnsanda karotis arter sistemi	11
Şekil 6: Ratların beyin anatomisi	14
Şekil 7: İskemide kalsiyum homeostazisi	18
Şekil 8: Rifampisin kimyasal yapısı	25
Şekil 9: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	33
Şekil 10: Serum MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	35

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Bederson skalası	8
Tablo 2: Deneysel beyin iskemi reperfüzyon yaralanmasında takip parametreleri	9
Tablo 3: NMDA reseptör aktivasyonu	16
Tablo 4: Serbest radikal oluşumuna neden olan kaynaklar	22
Tablo 5: Bederson nörolojik muayene skalasına göre puanlama	35
Tablo 6: Gruplara göre doku MDA ve serum MDA ortalamaları.....	37
Tablo 7: Grupların serum MDA ortalamalarının karşılaştırılması.....	38
Tablo 8: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson motor skorları	39
Tablo 9: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson skorlarının median ve min-max değerleri	40

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Resim 1: Supine pozisyonunda paratrakeal alanların disseksiyonu	27
Resim 2: Sol A. Carotis Communis Yaşargil klipi yerleştirilmesi	27
Resim 3: Bilateral A. Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klipi yerleştirilmesi	28
Resim 4: Sütüre edilmesi.....	28
Resim 5: Sıçanların ayrı ayrı yerleştirilmesi	29
Resim 6: Sıçanlar besin ve suya ulaşabileceği ayrı ayrı yaşam alanları.....	29
Resim 7: Sakrifiye edilen ratların beyin dokusunun çıkarılması.....	30
Resim 8: Beynin Hipokampus, C. Striatum, Corpus Kallozum ve Talamus kısımlarının ayrılması	30

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Grafik 1: Doku MDA ortalamaları	37
Grafik 2: Serum MDA ortalamaları.....	37



1. GİRİŞ

Beyin dokusunda oluşan iskemik beyin hasarı, santral sinir sisteminin kanlanmasını sağlayan damarsal yapıların hastalıkları sonucu oluşan damar tıkanıklıkları veya kanamaların sebep olduğu akut veya iktal, fokal veya global nörolojik bulguların ortaya çıkması olarak açıklanabilir (1). Dünya Sağlık Örgütü ise stroke'u "ani gelişen, 24 saat içerisinde ya da daha uzun süren, mortaliteye sebep olabilen, beyin fonsiyonlarının bölgesel ya da tamamının bozulmasına bağlı gelişen semptomlar" olarak açıklamaktadır (2,3). İnme olgularının %80-85'lik kısmı iskemik, %10-15'lik kısmı ise hemorajileri bağlı olarak görülmektedir (4,88).Türkiye'de tüm ölümlerin % 40.6'sı kardiovasküler hastalıklara, % 6.8'i serebrovasküler hastalıklara bağlı olarak görülmektedir. Bu oranlar göstermektedir ki serebrovasküler hastalıklar Türkiye'de üçüncü en sık ölüm nedenidir (5). ABD'de yılda 700.000 yeni inme olgusu gelişmekte olduğu ve bu olguların %20'sinin aynı yıl içerisinde ölümlerle sonuçlandığı bildirilmektedir (6,7). Mortalite ile sonuçlanmayan olgularda ise hastaların yaşam kalitesini çok ciddi şekilde etkileyen ve günlük yaşamda yardıma muhtaç bireyler olmasına sebep olan önemli bir patoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (8,9).

Kısaca bahsedilen bu istatistiksel veriler ve bulgular sebebiyle, iskemik beyin-damar hastalığı'nın patolojisi ve tedavisine yönelik elimizde çok sayıda çalışmalar ve çeşitli deneysel modeller bulunmaktadır. İskemik inme ve sonuçlarının daha iyi anlaşılması için bu modellerin katkısı yadsınamamakla birlikte, halen aşılması gereken birçok sorunun da varlığı görülmüştür. Serebral iskemi sonrası gelişen serebral hasarın geri döndürülmesine yönelik halen net bir medikal ya da cerrahi olmamasına rağmen, iskemi sonrası oluşan sekonder hasarı önleme manasında çeşitli medikal tedaviler kullanılmaktadır. Serebral iskemi geliştiği sırada kan akımının azaldığı fakat geridönüşümsüz doku hasarının henüz ortaya çıkmadığı "penumbra" diye adlandırılan tam manasıyla "kurtarılabilir doku" güncel tedavi protokollerinin temel hedefidir (10). Bu kadar ciddi bir patoloji olması sebebiyle hipotermi ve lokal soğutma, steroidler, glutamat antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, dimetilsulfoksit, isoproterenol, kalsiyum kanal blokörleri, aminofilin, mannitol, endojen opioid antagonistleri, vitamin E ve C, BOS basıncının azaltılması,

sodyum kanal blokörleri, nikotinamid ve TRH gibi çok sayıda yöntem ve tedavi hasarın önlenmesi açısından günümüzde kullanılmaktadır (11).

Günümüzde, fokal serebral iskeminin patofizyolojisini çalışmak için sıçanlarda bilateral karotis communis kliplenerek serebral akımın azaltılması ya da tamamen kesilmesi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (12). Minimal invaziv işlem gerekliliği, kolay uygulanabilir olması ve intrakranial basıncı etkileyen kraniyektomi gereksinimi olmaması nedeniyle çalışmamızda bu model kullanılması uygun görülmüştür.

Rifampisin antitüberküloz ajan olarak kullanılan makrosiklik grubu bir antibiyotiktir. *Streptomyces mediterranei* den üretilen yarı sentetik bir antibiyotik olan rifampisin (3- [[(4-methyl-1-piperazinyl)imino] methyl]-5,6,9,17,19,21-Hexahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl8[N-(4-Methyl-1piperazinyl) formimidoyl] -2,7-poxypentadeca [1,11,13] trienimino) naphtha [2,1-b] furan-1,11-(2H)-dione21-acetate[13292-46-1]), ana görevi serbest radikalleri yıkmasıdır. Birçok çalışmada rifampisin radikal yıkıcı etkisi gösterilmiştir. Rifampisinin nöroprotektif etkisinin yanında glukokortikoid reseptör aktivasyonu da gösterilmiştir (13,14,15).

Tüm bu çalışmalar göz önüne alarak, sıçanlarda deneysel fokal beyin iskemisi yaratmak suretiyle, iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerine rifampisin' in nöroprotektif etkilerini araştırmak hedeflenmiştir.

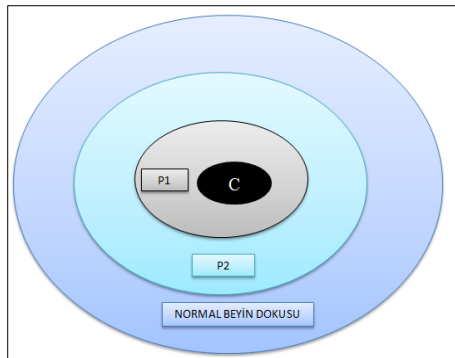
2. GENEL BİLGİLER

İskemik beyin hastalıkları ölüm ve edinilmiş engelliğin önde gelen nedenidir (16, 17). Serebral iskemi beyne giden kan akımını azalması ya da tamamen kesilmesi ile oluşan oksijen ve glukoz yoksunluğu sonucu oluşan hasardır. Dünya Sağlık Örgütü' nün tanımlamasında da belirtildiği gibi stroke; 24 saati geçen, ölümlle sonuçlanan, damarsal sebep olmaksızın, beyin fonksiyonlarının kısmı bazen de tamamen bozulması olarak tanımlanmıştır (18). Global ve fokal iskemi olarak birbirinde farklı lezyonlar oluşturmasına rağmen temelde benzer patofizyolojiye sahip iki gruba ayrılabilirler (19). Global iskemi sırasında kan akım miktarı %3 seviyesine kadar düşmekte ve akım kollateraller aracılığı ile yapılmamaktadır. Sonuçta 5-15 dk üzerine olan beslenme yetersizliği geri dönüşümsüz hücre hasarını başlatmaktadır (20,21). Fokal serebral iskemi de ise kollateral dolanım düşük düzeyde de olsa kan akımı mevcuttur (22). Bu rezidü akım sayesinde hücre membran bütünlüğünü koruyacak, geri dönüşüme müsaade edecek metabolik aktiviteyi devam ettiren beslenme sağlanmış olur (23). Serebral iskemi esnasında *core*, *geçiş zon*, *penumbra* olmak üzere 3 farklı alandan sözedilmektedir. *Core*; hücrede nekroz olan bölge, *penumbra*; core etrafında ATP bulunmasından ötürü apoptozisin geciktiği bölge, *geçiş zonu*; *core* ve *penumbra* arasında serebral kan akımı erken düzelmediği takdirde core ile birleşebilen bölge olarak tarif edilebilir (24). Serebral kan akımı core bölgesinde 10-12 ml/100g/dk, geçici zonda 18ml/100g/dk, penumbra da ise 20ml/100g/dk üzerindedir. İnme sonrası oluşan beyin doku hasarı asidotoksisite, iyon dengesizliği, eksitotoksisite, oksidatif ve nitratif stres, enflamasyon, apoptozisi içeren birden çok karmaşık yolağın sonucu oluşmaktadır (25). Serebral parenkim içerisinde de hipoksiye tolerans açısından farklılıklar göze çarpar. Örneğin, beyaz cevher gri cevherden daha dayanıklı olmasına rağmen corpus striatum, hipokampus CA1 bölgesi, serebral purkinje hücreleri de hipoksiye oldukça duyarlı bölgelerdir (26). İskemi de birbiriyle ilişkili kaskadlarda ki eksitotoksisitenin yayılımında; aşırı kalsiyum ve diğer iyonların içeri girişi, hücre şişmesi, hücre içi kinaz ve protezların aktivasyonu, reaktif oksidatif ve nitrosatif ürünlerin aşırı üretimi hücre membran hasarı organel yetmezlikleri bulunmaktadır. Nöroprotektif stratejiler içinde glutamat reseptör antagonistleri (27), kalsiyum kanal blokerleri (28), serbest oksijen

radikallerini azaltan tedaviler (29), hipotermi (30) gibi bazı yöntemler umut vadetmektedir.

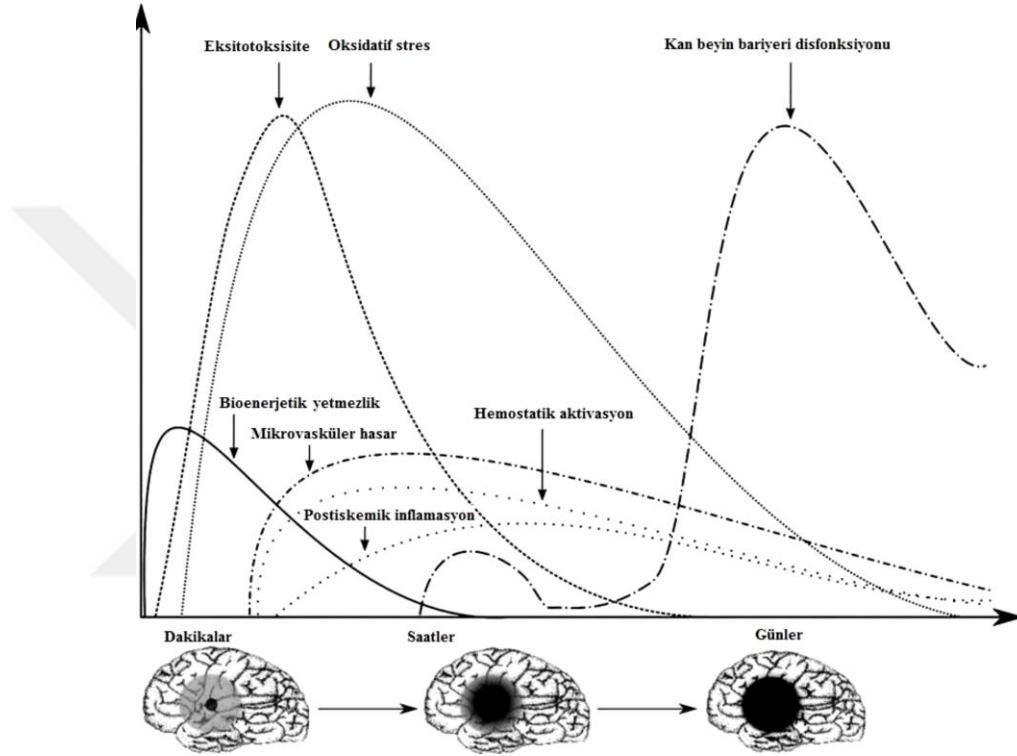
Nöronlar aktivitelerinin devamını sağlamak için özellikle oksijen ve glukozu bağımlıdır. Serebral kan akımı, normal serebral fonksiyonlarının devam edebilmesi için 55ml/100g/dk olarak otoregüle edilmektedir. Bu otoregülasyon nöronların membran potansiyeli, nörotransmitter oluşturması, depolanması, böylelikle hücrenin yapısal bütünlüğünün devam ettirilmesine katkı sağlar (31,32,33) Serebral kan akımı, 20 ml/100g/dk 'nın altına indiği takdirde oksijenin beyin parankimindeki ekstraksiyon fraksiyonu en yüksek düzeyde bulunur bunun sonucu olarak oksijenin dokudaki metabolizması hızla azalmaya başlar. Tüm bunların sonucunda beyinde iskemi ile meydana gelir (34). İskeminin core bölgesine yakın alanlar ise kritik bir şekilde (15-18 ml/100g/dakika) hipoperfüze olmaya başlar. Bu şekilde perfüze olan hücreler membrandaki Na/K pompaları çalışmaz ve pompanın disfonksiyonuna bağlı olarak elektriksel aktivite ortadan kalkar (35).

İskemik hasar sırasında etkilenmiş olan alanlar; C: core alanı (beslenmesi 10-12 ml/100g/dakika'dan az olan alan), P1: core'a en yakın alan (beslenmesi 18 ml/100g/dakika'dan az olan alan) ve erken dönemde perfüzyonun düzelmemesi halinde doku kayıp riskinin olduğu alan, P2: İskemik risk altındaki penumbra alanı (perfüzyon yetersizdir fakat genellikle ölüm ile sonuçlanmaz), N: Normal parankim (penumbra dışı alan). (Şekil 1) (36).



Şekil 1: C: core alanı (beslenme: 10-12 ml/100g/dakika), P1: core'a en yakın alan (beslenme: 18 ml/100g/dakika) ve erken dönemde perfüzyonun düzelmemesi halinde doku kayıp riskinin olduğu alan, P2: İskemik risk altındaki penumbra alanı (perfüzyon yetersizdir fakat genellikle ölüm ile sonuçlanmaz), N: Normal parankim (penumbra dışı alan)

İnmeyi takip eden süreçte oluşan beyin hasarı, eksitotoksisite, asidotoksisite, iyonik dengesizlik, peri-enfarktüs depolarizasyon, oksidatif ve nitratif stres, infalamasyon ve apoptozisi gibi birçok mekanizmanın birlikte etkisiyle meydana gelir (25). Bu süreçlerin bir kısmı dakikalar içerisinde oluşmaktayken, diğerleri saatler ve günler sürebilen nöroglial ve endotelial hücre gruplarının zarar görmesine yol açmaktadır (Şekil 2)(36).



Şekil 2: Serebral fokal iskeminin zamansal görünümü.

Kanlanmanın mümkün olamadığı core bölgesinde eksitotoksik ve nekrotik doku kaybı çok kısa sürede gerçekleşir (17, 25). Kollateral akım stroke alanının çevresinde iskeminin yarattığı tüm etkilerinden korunan iskemik alanın periferindedir (25). İskemi sırasında oluşan ardarda hızlı bir şekilde oluşan kaskadlardaki eksitotoksisitenin erken açığa çıkmasında; fazla miktarda kalsiyum ve diğer iyonların hücre içine dolması, hücre ödemi, hücre içi kinazların ve proteazların aktifleşmesi, reaktif oksidatif ve nitrosatif elemanların fazla miktarda açığa çıkması, hücre membranlarının zarar görmesi ve sonuç olarak organel fonksiyonlarının bozulması ile sonuçlanmaktadır. Bu bileşenlerin bir araya gelmesi sonucunda saatler içinde oluşmaya başlayan ve daha yavaş gelişen bir inflamasyon süreci de ortaya

çıkır. Bu durum kemokinlerin ve P selektinin, nötrofil ve makrofajların doku içine göçünü uyaran intersellüler adhezyon molekül-1'in (ICAM-1) ve endotelial adhezyon moleküllerinin aşırı artışına neden olur. Sitoplazmada meydana gelen kalsiyum iyon artışı, mitokondriyal düzeyde ki elektron transport zincirini fonksiyonunun bozulması, süperoksid anyonunun ortaya çıkması ve peroksinitrit üretimini destekleyen nitrik oksit oluşması da artar (37,38). Bununla birlikte endotelin salınması, trombosit ve lökosit uyarılması, geçmiş koagülasyon ve endotel fonksiyon bozukluğu patofizyolojik süreçlerin birer parçasıdır (39). İskemi sonrası glutamat miktarında artar, astrosit disfonksiyonu olur ve sonuçta astrositlerin glutamat yıkımı da bozulur (24,40,41). Ca'un lipid peroksidasyonu, serbest radikal oluşması, proteolitik enzimlerin aktive olması, gen aktivasyonu gibi kaskadlar neticesinde, geri dönüşümsüz nöronal hasar miktarı fazlalaşır (39). Bölgesel serebral iskemide, en çok etkilenen core alanında nekroz oluşur, penumbra da hasarlanmamış nöronlar bulunur. Kollateral dolaşım devam ettiği için ve beslenme minimale inmediğinden kısa süreli bölgesel iskemide, global iskemide gibi enfarkt hızlı bir şekilde gelişmez. Bölgesel serebral iskemide infarktın merkezinde bulunan damarsal yapılardan intrasellüler adhezyon molekülü-1'in (ICAM-1) üretimi olur. ICAM-1 iskemik dokuya nötrofil girişinin anahtarıdır. ICAM-1 ve ELAM-1 (endotelial lökosit adhezyon molekülü-1) iskeminin 3-6. saatlerinde ortaya çıkmaya başlar. Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) de iskeminin 2. saatinde core alanında artışa geçer ve neticesinde kan beyin bariyerinin geçirgenliğini üst sınırlara çıkarır sonuç olarak da hücre infiltrasyonuna sebep olur. Bölgesel iskeminin ardından interlökin-1 (IL-1) oluşumu hemisferlerde, IL-10 ise yalnızca iskeminin meydana geldiği hemisferde artar sonuç olarak iskemik hasar oluşumunu artırır. Koruyucu etkisi olan IL-6 beyin tamamında artar. TNF- α astrositler ve endotelden üretilir ve mevcut iskemik hasarı fazlalaştırır (20, 21, 42,43). Bölgesel serebral iske mi ardından, hücre sel ve humoral bağışıklık sisteminde süregelen süreçlerin artması kan beyin bariyeri disfonksiyonu, vasküler kan akımı azalması gibi birçok sayıda hasara neden olmaktadır (17). İskemi izleyen süreçte nöron ölümü 4-5. Saatler arasında ortaya çıkar. Bununla birlikte alanın perfüzyonuyla ilişkili olarak 4-5 güne kadar uzayabilen bir süreci de içine alır. Bu sebeple iskemi-reperfüzyon ilişkisinin ele alınmasında bu elemanlar da dikkate alınmalıdır. Akut dönemde nöronlarda meydana

gelen ultrastrüktürel bulgular, heterokromatin yoğunlaşması, endoplazmik retikulum sisternalarında genişleme, mitokondriyal iç matrikste şişme olup, genellikle yeniden kanlanma sonrası geri dönen parametrelerdir (44). Bahsedilen bu süreçlerin tamamı, iskemi-reperfüzyon anında endojen nöroprotektif mekanizmalar da devreye girer. İskeminin ardında nöronal ve glial hücrelerin büyüme, farklılaşma, çoğalma ve göçünü sağlayan birçok nörotrofik unsurların dokudaki düzeyinde arttığı bilinmektedir. Bunların içinde vasküler endotelial growth faktör (VEGF); endotel hücrelerinin artması ve vaskülarizasyon üzerinde ciddi bir etkisi vardır. Hipoksiye maruz kalan dokularda oksijen basıncının azalması, VEGF artışına sebep olur. Hipoksik dokuda düzeyi yükselen HIF (hipoksi inducible faktör) ekspresyonunun, VEGF ve eritropoetin düzeyini artıran etmenlerden biri olduğu, VEGF'nin anjiogenezden ilişkisiz şekilde nöronlarda koruyucu etkileri olduğu, vaskülarizasyon üzerine etkisi dışında, hücre devamlılığının muhafaza edilmesinde etkin olduğu bilinmektedir. İskemik hasara sonucu hücre cevabı olarak, infarkt alanında bulunan mikrogliya, astrositlerden HSP (heat shock proteins) miktarında artış olur. HSP' nin de nöroprotektif özelliği vardır (24, 45, 46). Bütün bu anlatılan bilgilerden yola çıkılarak iskeminin karmaşık yollarının anlaşılması, nöron koruyucu mekanizmaların bilinmesi önem arz eder. Bunlar hem tedavide hem de iskeminin önlenmesi açısından büyük katkı verir. Serebral iskemi de tedavi yaklaşımı geliştirilmesinde nöron kaybı, disfonksiyonu ve reperfüzyon hasarı önlenmesi dikkate alınması ve araştırılması gereken unsurlardır.

2.1. Tarihçe

Serebrovasküler hastalıklar çok uzun yıllardır bilinen bu nedenle tedavisi ve nedenlerinin araştırılması da çok eskilere dayanan patolojilerdir. Serebrovasküler hastalıkların çoğunda klinik tabloyu iskemik değişikliklerin belirlediği bilinmektedir. Deneysel araştırmalar çok çeşitli hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Nörolojik olarak davranış, motor-duysal özellikler ve neokorteksin göreceli miktarı gibi nedenlerle subhuman primatlar insana en yakın hayvan grubunu oluşturmaktadır. Ancak temini, bakımı ve maliyetinin yüksek olması gibi sıkıntılar serebral iskemi modellerinde yaygın olarak kullanılmaları için engel teşkil eder. Son yıllarda tavşanlar, gerbiller ve sıçanlar üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Kolay bulmak, ucuz olması çeşitli nörotransmitter sistemlerinin, nörokimyasının ve nörofarmakolojisinin diğer

hayvanlar göre daha ayrıntılı bilinmesi ve en önemlisi serebral dolaşım anatomisinin insana büyük benzerlikler göstermesi özellikle son 20 yıldır sıçanların en çok kullanılan hayvan türü olmasını sağlamıştır. 1960 yılında Levine S. sıçanlarda deneysel beyin iskemisi yaratarak yayınlamıştır (47). 1982 yılında Pulsinelli ve arkadaşları 4 damar oklüzyonu sonrası global iskemi modelini yayınlamıştır (48). Deneysel serebral iskemi oluşturulması için iki damar oklüzyon ve dört damar oklüzyon modellerinin temeli 1960'lı yıllara dayanmaktadır.

Global İskemi Modelleri:

- 1- *Sıçanlarda dört damar oklüzyon modeli:* İki taraflı vertebral arterler kalıcı olarak koterize edilir, iki taraflı ana karotis arterler ise geçici olarak 10–30 dakika süreyle klemple kapatılır (49).
- 2- *Sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modeli:* İki taraflı ana karotislere geçici oklüzyon ve es zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 50 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır (49,50).
- 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 (51).
 1. Global ve fokal iskemi sonrası nörolojik değerlendirmeyi Bederson ve ark. yayınlamıştır (52), (Tablo 1).

Nörolojik muayene

Tablo 1: Bederson skalası

Grade 0	Nörolojik defisit yok	5 puan
Grade 1	Ön bacaklarda flexiyon	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 2).

Tablo 2: Deneysel beyin iskemi 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

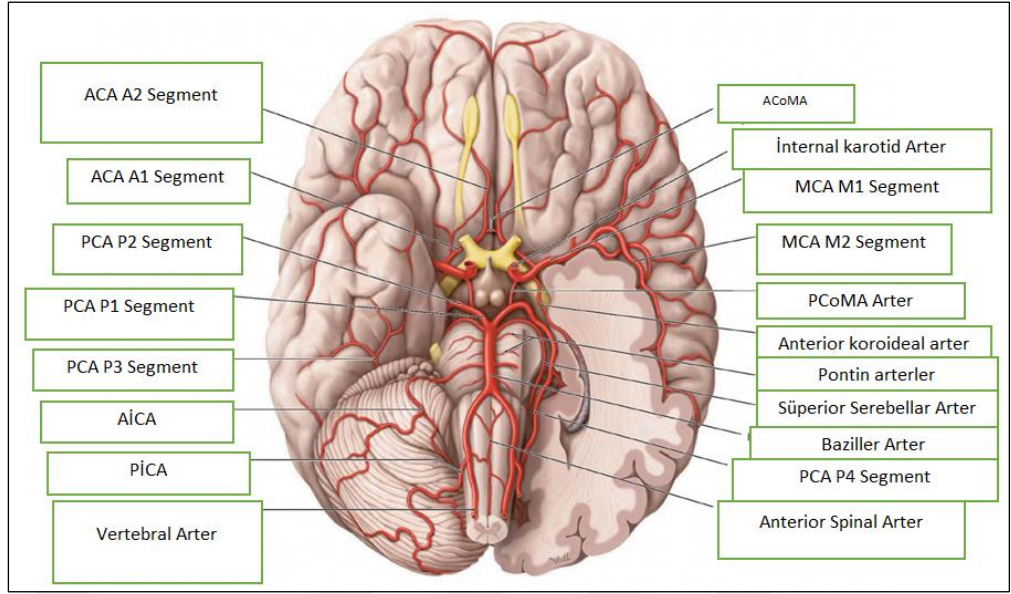
Biyokimyasal ölçümlerle değerlendirme

(Malondialdehit, Myeloperoksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vs)

Nörofizyolojik değerlendirme: Uyarılmış potansiyeller, EEG

2.2. İnsan Serebrovasküler Sistem Anatomisi

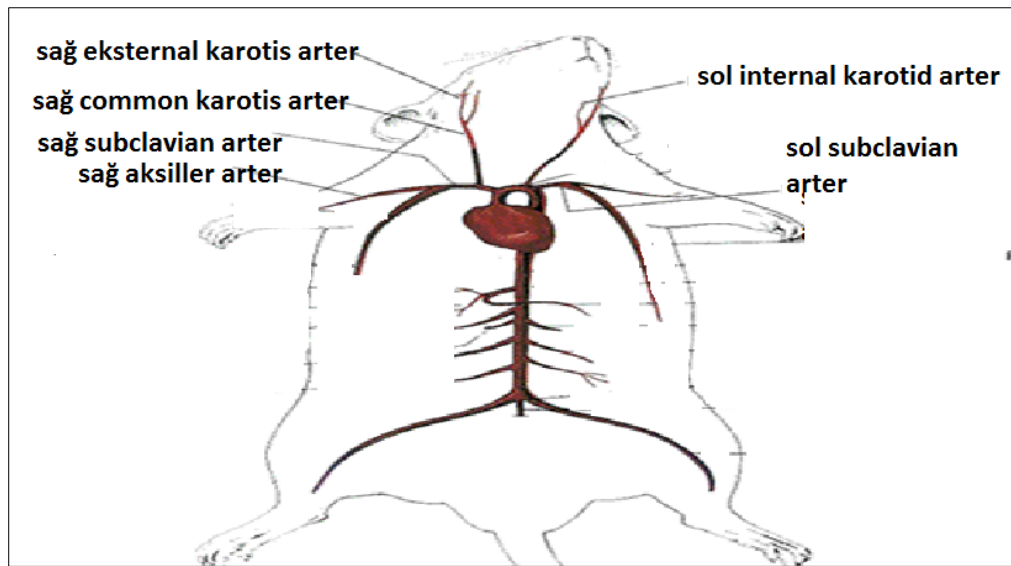
Beyin iskemisi modellerinin anlaşılması için damar anatomisi önemlidir. Kalp debisinin yaklaşık olarak 1/5 beyin dokusu alır ve dakikada 800 mL kadar kan akımı olur. Beyin temel olarak iki taraflı arteria karotis interna ve arteria vertebralis ile bunların oluşturduğu sirculus arteriosus cerebri'den (Willis poligonu) çıkan arterler tarafından kanlandırılır. Arteria karotis interna boyun bölgesinde kanalis karotikus'tan geçerek kranium boşluğuna girer. Bu arter beyin içine bol miktarda dallar verir. Arteria vertebralis ise arteria subclavianın birinci parçasından çıkar. Altıncı servikal vertebradan itibaren processus transversuslardaki foramen transversarium'ların içinde yukarı doğru yükselir, foramen magnum'dan geçerek kranium boşluğuna girer. Özellikle beyin arka kısımlarını besleyen dallar verir. Kranyum içinde ponsun alt kenarı hizasında iki vertebral arter birleşerek baziller arteri oluşturur. Bu arter daha sonra interpedinküler sisterna içinde iki taraflı arteria karotis internaların dallarıyla birleşip Willis poligonunu oluşturur (Şekil 3). Bu yapıyı oluşturan arterler, arteria serebri anterior, arteria serebri media, arteria serebri posterior, arteria kommunikantes anterior, arteria kommunikantes posteriordur.



Şekil 3: Willis poligonu

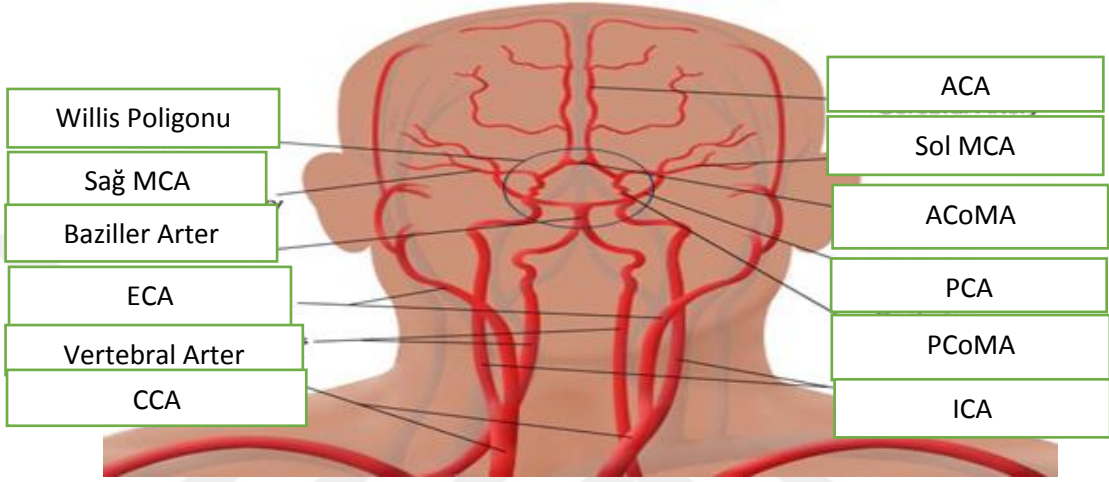
Kommon Karotid Arter (KKA): Beyin; iki adet internal karotid arter (IKA) ve iki adet vertebral arter (VA) olmak üzere dört damar tarafından beslenmektedir. Trunkus brakioyosefalikus, arkus aortadan çıktıktan 4-5 cm sonra sternoklavikular eklem hizasında sağ KKA ve sağ subklavian arter olarak ikiye ayrılır. Yukarı doğru kılıf içinde ilerleyen KKA'ler hiç dal vermeden 4.servikal vertebra hizasında İnternal karotid arter ve Eksternal karotid arter olarak ikiye ayrılır.

Sıçanlardada insanlara benzer arteriel dolaşım mevcuttur (Şekil 4).



Şekil 4: Ratlarda arteriel dolaşım

Eksternal karotid arter (EKA): Superior tiroidal arter(1. Anterior dal), assenden faringeal arter, lingual arter, fasial arter (Dalları oftalmik ile anastomoz yapar), oksipital arter, posterioraurikular arter, superfisial temporal arter (Frontal ve paryetal dal), maksiller arter(İnfracorbital, inferior alveolar, orta meningeal, aksesuar meningeal dalları bulunur) verdiği dallardır (53) (Şekil 5).



Şekil 5: İnsanda karotis arter sistemi

İnternal karotid arter (IKA): EKA'nın lateralinde ve posteriorunda yer alır. Anatomik ve radyolojik olarak farklı birçok sınıflama olmasına rağmen kabaca servikal, petröz, kavernöz ve supraklinoid olmak üzere dört segmenttir. Temporal kemiğin petröz parçasına kadar olan servikal bölgede hiç dal vermez.

Anterior Serebral Arter (ASA): ASA, optik siniri üstten çaprazlar. Karşı tarafın a.serebri anterioru ile anterior kommunikan arter (AkoA) aracılığıyla anastomoz yapar (53).

Orta Serebral arter (OSA): Beş segmente ayrılır. Bifurkasyona kadar olan horizontal kısım M1, bifurkasyondan sylvian fissürden çıkana kadar olan bölüm M2, distal dallar M3 ve M4, terminal dallar M5 olarak adlandırılır (53).

Vertebral Arter (VA): A.subklavia'nın birinci bölümden ayrılır. 6. servikal vertebradan itibaren foramen transversiumlarından geçtikten sonra atlasın superiorundan medialine yönelir. VA'nın 4 segmenti vardır. Birinci segmenti VA'nın subklavian arterden orijin aldığı yerden transvers foramene girene kadar olan

bölümüdür. İkinci segmenti C2-C6 vertebralar arası transvers foramenlerde uzanır. Üçüncü segmenti C2 Vertebra'dan foramen magnum'a kadar uzanan bölümüdür. Dördüncü segmenti foramen magnum durasından vertebrobaziler bileşkeye uzanır. Foramen magnumdan geçerek kraniuma ve karşı tarafın A.vertebralis ile birleşerek A.basilarisi oluşturur. Kafa boşluğu (İntrakranyal) içinde verdiği dallardan en önemlisi a. inferior posterior cerebelli' dir.

Baziller Arter (BA): Her iki A.vertebralis'in bulbusun üst sınırında birleşmesiyle oluşur. Ponsun anteriorunda sulkus basilaris içinde uzanır. Ponsun üst kenarı seviyesinde terminal dalı olan posterior serebral arterlere (PSA) ayrılır. Pons ön yüzünde seyrederken; a. Labyrinthi, aa. pontis, a. inferior anterior cerebelli, a. inferior superior cerebelli ve a. cerebri posterior dallarını verir.

Vertebrobaziller dolaşım beyin sapı, spinal kord, serebellum, internal kapsül, talamus, bazal ganglia, inferior temporal korteks ve oksipital korteksin beslenmesini sağlarlar. Posterior ve anterior dolaşım kafa tabanında birleşerek Willis Poligonunu oluştururlar. Willis poligonundaki kan akımında en önemli kolleteral yollaklardır. Anterior komminikan arter vasıtasıyla biraraya gelen anterior serebral arterler, arkada posterior serebral arterler ve bu iki arter grubunu biraraya getiren posterior komminikan arterler'in anastomozundan oluşur (53).

1. *İntrakranial anastomozlar*; başlıca Willis poligonunda olmak üzere, kortikal düzeyde ve serebellumda olur.

2. *Ekstrakranial-intrakranial anastomozlar*; EKA ile oftalmik arter, EKA meningeal ve etmoidal dalları ile serebral arterlerin leptomeningeal dalları arasında olur.

3. *Ekstrakranial anastomozlar*; Servikalde VA ve EKA arasında olur.

2.3. Beyin Dokusu Histolojisi

2.3.1. Nöron

Sinir dokusunun temel hücresi nöronlardır, karmaşık yapıda, birbirinden bağımsız, anatomik ve fonksiyonel ünitelerdir. İmpulsarı alıp, biryerden başka biryere taşımak, bazı hücrel mekanizmaları başlatmak, nörotransmitterleri ve diğer unsurları üretmek nöronların yaptığı bazı işlevleridir (54).

Nöron, gövde kısmı (perikaryon) ve akson-dendrit olarak adlandırılan sitoplazmik uzantılardan oluşur. İki çeşit sitoplazmik uzantı bulunur:

- *Dendrit*: Etraftan gelen uyarıyı alan geniş alıcı bir yüzey oluşturan yapılarıdır.
- *Akson*: Akson tektir, uyarıyı diğer hücelere (nöron, kas, bez) aktaran ve moleküllerin taşınmasında görevlidir (55).

Perikaryon, nöron hücresinin çekirdek ve çevresindeki sitoplazmadan oluşur. Yorgunluk ya da nöronda oluşan hasar halinde, Nissl cisimciğinin yer değiştirmesine ve sitoplazmanın periferinde birikmesine sebep olur (56).

Fazla miktarda granülsüz endoplazmik retikulum bulunur. Taşıma ve sinaptik veziküller'e kaynak oldukları, proteinleri hücre bütününe taşıdıkları ve kalsiyum depoladıkları bilinir.

Golgi cisimciği çekirdeğe yakın yerleşimlidir ve iyi gelişmiştir. Çekirdek etrafında sıralanır ve fazla sayıda paralel düz sisternalar içerir.

Nöron'un strüktiyel yapısında 3 farklı flaman bulunur: mikrotübüller, nöroflamanlar ve mikroflamanlar.

2.3.2. Glia Hücreleri

Nöronlar sinir sisteminin temel hücreleridir, glia hücreleri ise nöronlara metabolik ve mekanik olarak katkı sağlayan hücre grubudur (56). Santral sinir sistemi 4 tip nöroglia hücrelerinden oluşur:

Astrositler en büyük glial hücrelerdir. Uzantılarının fazla olması sebebiyle e yıldız benzeri hücrelerdir. Astrositler nöron hücrelerinin iyonik ve kimyasal ortamını dengede tutar. Kan beyin bariyeri (KBB) adı verilen damarsal yapı ile beyin parenkimi arasında ki yapıyı oluştururlar.

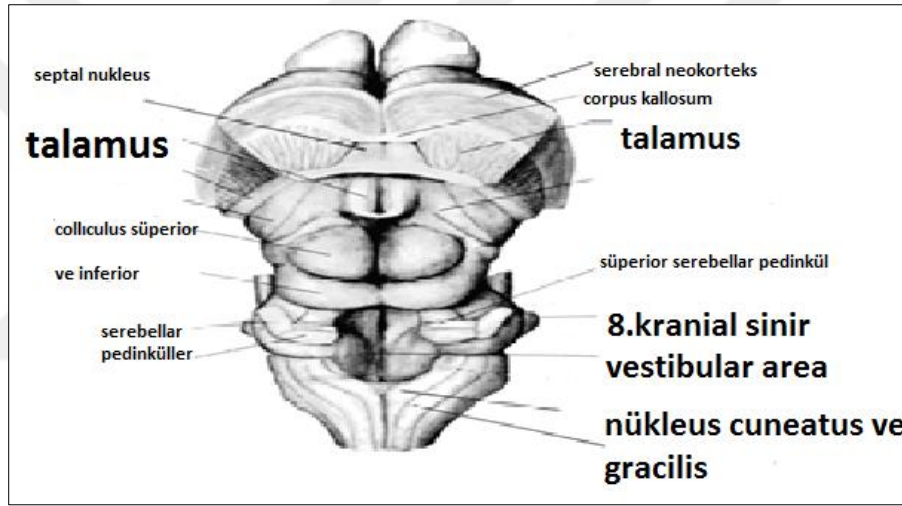
Oligodendrositler astrositlere göre daha küçük glial hücrelerdir. Az miktarda, daha az dallı uzantılara sahiptir. Gri ve beyaz cevherinin her ikisinde de bulunurlar. Myelin kılıfın yapımından sorumludurlar.

Ependim hücreleri SSS boşluklarını örten prizmatik silialı epitelyum hücreleridir.

Mikroglia en küçük glial hücrelerdir. Uzantıları kısa, uzamış hücrelerdir. Nötral proteazlar ve oksidatif radikaller üreterek inflamasyon ve hücre tamirinde rol oynarlar (55,57).

2.4. Memelilerde Hipokampal Oluşumun Anatomik ve Histolojik Özellikleri

Hipokampus gelişimi esnasında, başlangıçta dorsalde yer alırken daha sonra temporal lobun ventral ve medialine yerleşir. Aynı zamanda dış yüzü koçboynuzuna benzediğinden dolayı cornu ammonis (CA) adı ile de anılmaktadır (58). Hipokampus temporal lobun korteks kısmının lateral ventrikülün ön yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru katlanması ile şekillenir (59) (Şekil 6).



Şekil 6: Ratların beyin anatomisi

Granüler ve piramidal hücrelerin dentritleri moleküler tabakaya yayılır. Ayrıca piramidal hücre tabakasında daha büyük piramidal hücreler vardır. Bunların dentritleri hem moleküler tabakaya hem iç tabakaya uzantılar verirler. İçte ise polimorfik tabaka yer alır. Bu tabakada piramidal ve granüler hücrelerle bazı glial elemanlar bulunur. Hipokampusun en iç sınırında yani lateral ventrikülle olan komşuluğunda, subikulum ve hipokampusdaki hücre gövdelerinden çıkan myelinli aksonlardan oluşan bir tabaka bulunur ki bu tabakaya alveus denir. Cornu ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapılanmasına göre incelendiğinde CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt

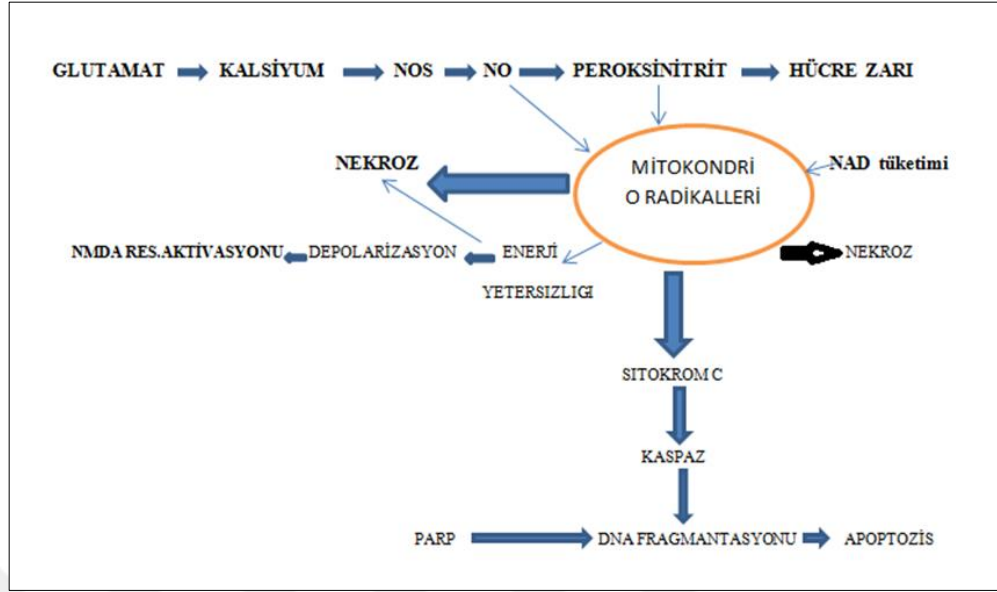
bölgeye ayrılır. CA1, subikulum ile hipokampus arasındadır. CA2 ve CA3 hipokampusda, CA4 ise hipokampusun girus dentatus ile birleşim yeridir (58,60).

2.5. İskemi-Reperfüzyon Yaralanmasının Patofizyolojisi

İskemi, kan akımı azlığı sebebiyle dokuya ihtiyaç duyduğu oksijen ve metabolitlerin sağlanamadığı patolojik bir süreçtir. Nöral doku oksijen depo edemediği ve rejenere olamadığı için iskemiye çok duyarlıdır. Oksijen düzeyi kritik eşiğin altına indiği takdirde canlılığını devam ettiremez. Oluşan hasarın boyutu, hipoksi süresi ve şiddetiyle ilişkilidir. Hipoksi anında, hücre canlılığının sürdürülebilmesi açısından gerekli enerji (ATP), glikojen depolarından glikolizden yani anaerobik metabolizmadan sağlanır. Bu süreçte aerobik glikoliz durma noktasına gelir, sonuçta ATP'nin yalnızca % 7'lik kısmı bu yolla elde edilir (61).

Normal ısıda 3-4 dakika süren iskemiye takiben ATP depoları tükenir, sonuçta mitokondiyal oksidatif fosforilasyon yapılamaz. ATP miktarı sıfıra yaklaştığında hücre içi iyonik homeostazis için gereken ATP ile çalışan hücre membran iyon pompaları fonksiyonunu kaybeder (62). İskemi sonrası erken dönemde hem beyaz hem de gri cevherde hücreler arası mesafede potasyum ve hidrojen iyon konsantrasyonları hızlı bir artış gösterir. Potasyum seviyesindeki yükselme hücre membranlarında depolarizasyona yol açarak aksiyon potansiyellerinin bloke olmasına ve kontrolsüz nörotransmitter salınımına neden olur (63). Glial membran depolarizasyonu glial hücrelerde eksitator glutamat dahil nörotransmitterlerin geri alınımının azalmasına neden olarak hücre içine sodyum, kalsiyum ve su girişine, dolayısıyla intrasellüler ödeme yol açar. Ekstrasellüler mesafede pH, K^+ , H^+ ve laktik asit birikimiyle düşer. Oluşan asidoz nöron ve glial hücre membranları üzerine doğrudan toksik etkide bulunabilir ve/veya iyon kanallarının fonksiyonunu bozarak N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu ile oluşan akımı bloke eder(64). (Tablo 3)

Tablo 3: NMDA reseptör aktivasyonu



İrreversible hücresel hasar esnasında kalsiyum iyon dengesinin bozulması kilit adımdır. İskemi sırasında, hücre içi kalsiyum hızla artar, kalsiyum seviyesindeki artma neticesinde sitoplazmik proteazlar ve nükleazların salınımını başlatır. Bunlar struktüyel proteinlerin ve DNA'nın zarar görmesine sebep olan enzimlerdir. Kalsiyumun uyardığı fosfolipazlar, membran lipidlerini araşidonik asit ve diğer vazoaktif metabolitlere dönüşümünü sağlarlar. Endotelial ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza çevrilir ki bu enzim yeniden kanlanma sırasında serbest radikal oluşumunda görevli oldukça önemli bir ajandır. Sonuçta, hücre içi kalsiyum düzeyinde ki artış, nörotoksik etkisi yüksek olan aspartat ve glutamatın artmasına sebep olur (62).

İskemi sonrası resirkülasyon veya reperfüzyon, iskemik dokunun yeniden kanlanmasıyla, enerji ihtiyacının karşılanması ve hücresel homeostazisin yeniden sağlanması anlamına gelmektedir (61). Ancak, reperfüzyon sırasında açığa çıkan bazı toksik maddelere bağlı bölgesel doku hasarı ve uygunsuz sistemik etkiler, son yılların güncel konularındandır.

İskemi esnasında ATP'nin hızlı şekilde metabolize edilmesi sebebiyle ksantin ve hipoksantin düzeyleri yükselmektedir. Nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ın indirgenmiş şekli ve hipoksantin veya ksantin bulunduğu,

moleküler oksijenin ksantin oksidaz vasıtasıyla süperoksit ve diğer serbest radikallere dönüşmesi sağlanır.

2.6. Glutamat Eksitotoksitesi ve Kalsiyum Sitotoksitesi

İskemi süreci, eksitatör aminoasitlerden (EAA) olan aspartan ve glutamatın birikerek “eksitotoksite” mekanizmasının başlamasıyla sonuçlanır. Her iki aminoasit de beyin ve spinal kordda düzensiz dağılmaktadır (65). İskemi, adenozin 5-fosfat düşmesine sebep olarak, hücre homeostazında rol oynayan Na-K pompası gibi enerji gereksinimi olan mekanizmaların fonksiyonunu engeller. Hücre içi ve hücre dışı iyonik denge bozulur, membran şekli etkilenir, sinaptik caplerden EAA’lerin serbestleşmesi artar. EAA serbestleşmesi, nöroglial hücrelerin enerji odaklı geri alım özelliklerinde durmasıyla dengesizleşir.

Çalışmalarda EAA’ın sebep olduğu geç doku zedelenmesinde glutamat reseptörlerinin önemine vurgu yapmaktadır (63). Güncel çalışmalar glutamat reseptörleri “metabotropik” ve “iyonotropik” olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

İskemi esnasında ATP azalmasıyla Na-K pompası gibi enerji ihtiyacı olan mekanizmalar işlevini kaybetmektedir. Bu durum membrandaki potansiyelin bozulması, nöroglial hücrelerin depolarize olmasıyla sonuçlanmaktadır. Sonuç olarak presinaptik uçtan hücre dışı boşluğa fazlaca glutamat salınımı meydana gelir (66).

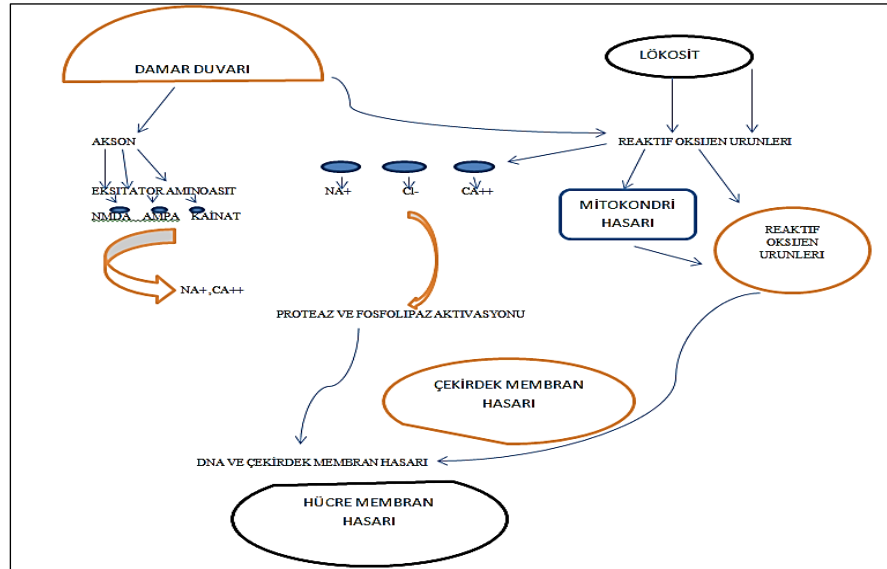
Santral sinir sisteminde güçlü etkileri olan glutamat, yüksek oranlarda bulunan eksitatör bir aminoasittir. Hafıza, öğrenme, hareket ve duyuşsal bağlantıların sağlanması gibi nörolojik işlevlerde görev alır (67). Glutamat, reseptörleri aracılığıyla etki gösterir:

1) İyonotropik Glutamat Reseptörleri: İyon kanalları aracılığıyla etki gösterir.

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

2) Metabotropik Glutamat Reseptörleri: Transmembran proteinlerine bağlı olarak bulunur ve uyarılması ile guanin nükleotid bağlayıcı protein (G protein) üzerinden etkisini ortaya koyan reseptörlerdir (68). İskemide bir taraftan büyük

oranlarda glutamat salınımı olurken, diğer taraftan da enerjiye bağlı olan presinaptik geri alma mekanizmalarının bozulması hücre dışı bölgede glutamatın fazla miktarda artmasına sebep olmaktadır. Bu durum AMPA ve NMDA reseptörlerinin aktive olması ile güçlü ve sürekli depolarizasyon ortaya çıkarır. İskemi oluşan beyin içerisinde fazla sayıda salınım yapılan eksitator aminoasitlerin sebep olduğu bu nöronal hasar'a "eksitotoksisite" denilir (69). Hem AMPA reseptörleri hem de NMDA reseptörleri aracılığıyla depolarizasyon sonrası voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktive olmasıyla yüksek oranda Ca^{+2} hücre içirisine alınır. Şartlar normal olduğunda hücre dışı Ca^{+2} düzeyi hücre içi alana göre 10.000 kata kadar yüksek olabilir. Miktar fazlalığında Ca^{+2} , voltaj gradyanıyla veya ATP aracılığı ile mitokondriye ve endoplazmik retikuluma girmekte ve buralarda birikim olmaktadır. Fazla birikim durumunda, endoplazmik retikulum (ER) içerisindeki Ca^{+2} glutamatın metabotropik olan reseptörünün aktive olmasıyla mitokondri içindeki Ca^{+2} da mitokondrial permeabilite transit (MPT) gözenekleri vasıtasıyla organelin dış kısmına, ancak hücre içerisine gönderilir. İntrasellüler Ca^{+2} da, Na-Ca degistirici sistemi ve ATP'yi kullanmak koşuluyla Ca^{+2} u ekstrasellüler alana çıkaran Ca pompası aracılığıyla ekstrasellüler alana atmakta ve bu sayede hemostaz devamlılığı sağlanmış olur(Şekil 7) (70).



Şekil 7: İskemide kalsiyum homeostazisi

İskemik şartlardaysa kalsiyumun aşırı birikimiyle ER ve mitokondriden intrasellüler alana gönderilmekte, ancak ATP aracılı sistem ve pompa bozukluğu

sebebiyle ekstrasellüler alana gönderilememektedir. Bu mekanizmalar sonucunda kalsiyumun intrasellüler alanda ki konsantrasyonunun aşırı şekilde artması ile neticelenir (70).

Glutamat reseptör aktivasyonu olduğunda en çok NMDA reseptörleri kalsiyumun intrasellüler alana alınmasına yol açar. NMDA reseptörlerinden kalsiyum geçişi olurken, AMPA reseptörleri kalsiyum dışında diğer katyonların da geçişine izin verir ve kalsiyumla birlikte sodyumda intrasellüler alana girer. Hücre içi sodyum düzeyinin artışı suyun pasif geçişini artırır. Bu yolla oluşan hücre ödemi, beslenmeyi bozar, intrakranial basıncı arttıran vasküler kompresyon ve herniasyona neden olan beyin ödeminin ilk aşamasından biri olarak ortaya çıkar (71).

Hücre hasarının başlamasında anahtar nokta kalsiyum iyon hemostazının bozulmasıdır. İskemi esnasında hücre içi kalsiyum hızla artmaktadır. İntrasellüler kalsiyumun artması hücrede potansiyel çok sayıda enzimi aktifleştirir. Sonuç olarak kalsiyum tarafından aktive olan proteaz, fosfolipaz, ATP^{az} ve endonükleaz aktivasyonu hücre hasarlanmasına sebep olur (72). Ayrıca intrasellüler kalsiyum depolarının serbestleşmesi ve mitokondriyle, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan hücre duvarında olan kalsiyum pompasının inaktive olmasına yol açarak bundan sonra glutamat düzeylerinden bağımsız bir şekilde, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu irreversible şekilde artar. Sonuçta intrasellüler kalsiyum fazlalığı, kalsiyuma bağımlı lipazlar ile proteazların aktivasyonu ve hücre iskelet bütünlüğünün bozulması ve hücrenin membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır (73).

2.7. Serbest Radikaller

Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, ömürleri kısa, kararsız durumda bulunan, oldukça etkin ve düşük molekül ağırlığa sahip moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar (74). Serbest radikal reaksiyonları normal biyolojik olaylarda geniş bir spektrum oluşturur ve birçok hücrel enzim ve elektron transport sisteminde katalitik fonksiyonlar sırasında ara ürün olarak oluşturulurlar. Serbest radikallerin dış yörüngesindeki tek sayıdaki elektron çiftlenme eğiliminde olduğundan dolayı aşırı reaktiftir. Bu reaktif özelliği sayesinde canlı hücrede varolan tüm moleküller ile reaksiyona gerçekleştirebilir. İnsan vücudunda pek çok serbest

radikalın varlığı bilinmekle birlikte, oksijen kaynaklı serbest radikaller en yaygın olanıdır. Serbest radikaller molekül yapılarına göre oksijen merkezli (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri), karbon merkezli (karbontetraklorür, triklorometal, aromatik hidrokarbonlar) ve sülfür merkezli (glutasyon) olarak gruplandırılırlar (75). Serbest radikallerin en önemli kaynaklarından birisi mitokondrial elektron transport zinciridir. Normal fizyolojik şartlarda mitokondrial elektron transport zincirinde %2-5 oranında süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşur. Bu radikaller glutasyon, vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavinoitler gibi normal savunma sistemindeki antioksidanlarca ve glutasyon peroksidaz, myeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimatik korunma mekanizmaları ile temizlenirler (74). Antioksidan enzimlerin başında gelen süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalize eden bir metalloenzimdir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon “oksidatif stres anında ilk savunma” olarak bilinmektedir. Çünkü süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının en güçlü aktivatörü süperoksittir. Bu sistem ile hücrel kompartmanlardaki O₂ miktarları kontrol altında tutulmaktadır. Buna karşın iskemi ve takip eden reperfüzyon sırasında oluşan enerji yoksunluğu oksidatif fosforilasyona ve kotrolsüz serbest radikal oluşumuna yol açar. İskeminin ve reperfüzyonun serbest radikal oluşturmasında tam net olmamakla beraber, iskemi esnasında artan intrasellüler kalsiyumun fosfolipaz-A₂ enzimini aktive ettiği ve karboksigenaz ve lipogenazların etkisiyle prostoglandinler ve lökotrienler meydana gelirken açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin meydana gelmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.

İskemik hasarın patofizyolojisinde rol alan başlıca oksijen ürünleri; süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, nitrik oksit ve peroksinitritlerdir. Reaktif oksijen ürünleri termodinamik dengeleri korumak için yakında bulunan diğer moleküllerden elektron veya hidrojen atomlarını serbestleştirerek bunları aktif radikal haline getirirler (76).

Serbest radikallerin kimyasal özellikleri birbirinden farklıdır. Bir yandan hücre membranı ve intrastoplazmik yapıları etkilerken diğer yandan da hücre dışı alana geçerek uzak etkilerini oluştururlar. Bu etki hızını belirleyen de çözünürlük ve difüzyon hızıdır.

Plazma membranları yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu “lipid peroksidasyonu” membranda bulunan fosfolipaz A₂, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimlerle oluşan araşidonik asit yıkım süreci ve transmembran iyon gradienti plazma membranlarında serbest radikal oluşumuna neden olan başlıca mekanizmalardır. Serbestleşen araşidonik asit ortamda yüksek konsantrasyona ulaşarak doğrudan mitokondriyal solunumu etkilerken aynı zamanda kendi katalitik süreç ara ürün olarak süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin oluşumunu tetikler.

Serbest radikaller, hücrelerde bulunan lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi bütün önemli elemanları üzerine etki gösterirler. Fosfolipaz, Proteaz, elastaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz benzeri litik enzimleri aktif hale getirirler. Serbest radikaller etkilerini birkaç yola gerçekleştirir.

Membran Lipidlerine Etkileri: Serbest radikaller, antioksidan sistemlerin kapasitesini aşacak miktarda oluştuğlarında membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikaller ile tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri meydana getirirler. Sonuçta genotoksik, mutajenik ve karsinojenik etki meydana gelir.

Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri: Serbest radikaller DNA'yı bozarak hücre mutasyonuna, karsinogeneze ve hücre ölümüne yol açabilirler.

Proteinlere Etkileri: Proteinler serbest radikallerden daha az oranda etkilenirler. Proteinlerde kırılmalar, agregasyonlar ve çapraz bağlanmalar oluşabilir.

Karbonhidratlara Etkileri: Serbest radikaller monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksid, peroksidler ve okzoaldehidler meydana getirirler.

Aerobik hücrelerin metabolizması sonucu oluşan serbest radikaller arasında oksijen ve türevleri önemli yer tutmaktadır. Serbest radikal bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron içeren bağımsız oluşma yeteneğindeki molekül olarak tanımlanmaktadır.

Oksijen türevi radikallerin biyolojik sistemlerde etkileri çok önemlidir. Organizmada serbest radikal oluşumuna neden olan kaynaklar endojen ve eksojen olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Serbest radikal oluşumuna neden olan kaynaklar

Eksojen Kaynaklar	Endojen Kaynaklar
Antibiyotikler	Mitokondrial taşınma
Anestetikler	Mikrozomal sistem
Sigara dumanı	Plazma zarları
İskemi	Fagositoz olayı
Hipoksi	Peroksizomlar
İnflamasyon	Çesitli sitozolik enzimler
Antineoplastik ajanlar	
Hava kirliliği	
Radyasyon	

2.8. Myeloperoksidaz (MPO)

Myeloperoksidaz (MPO), lizozomal bir hemoproteindir. Polimorf nükleuslu lökositler ve monositlerin azurofilik granüllerine yerleşir. MPO nötrofil proteinidir ve bu proteinlerin büyük bir kısmını oluşturur. MPO, lipofilik karsinojenleri hidrofilik formlara dönüştürerek aktivasyon gösteren faz 1 proteindir (77).

Glutasyon, vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavinoitler gibi normal savunma sistemindeki antioksidanlar ve glutasyon peroksidaz, myeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimatik korunma mekanizmaları serbest radikalleri yok eder.

MPO polisiklik aromatik hidrokarbonları, aromatik aminleri ve heterosiklik aminleri içeren sigara içimi ile olan karsinojenleri aktive eder ve karsinojenik serbest radikallerin endojen olarak oluşumunu katalize etmektedir (78).

Myeloperoksidaz aynı zamanda genotoksik hipokloroz asit ve diğer reaktif oksijen ürünlerinin üretimini katalize edilmesiyle nötrofillerde antimikrobiyal bir ajan olarak fonksiyon yapmaktadır (79).

Myeloperoksidaz geni iki alt üniteden (dimer) oluşmuş ve 17q23.1 kromozomu üzerinde lokalize olmuştur.

Hipokloröz asit, fagositik hücrelerce bakterilerin ortadan kaldırılmasında görev alan önemli bir bileşendir. Aktive olan monosit, nötrofiller ve makrofajlar, eozinofiller O₂ üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle nötrofiller ve monositler içerdikleri myeloperoksidaz enzimi vasıtasıyla oksijenin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirilerek çok güçlü antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür. Hipokloröz asit uzun etkili bir oksidan özelliğe sahip olduğundan bazı prokanserojen faktörlerin aktivasyonuna ve DNA'da hasara yola açmaktadır.

2.9. Lipit Peroksidasyonu ve Malonaldehit (MDA)

Serbest radikallerin en belirgin hasar verici etkisi hücre membranlarında oluşan lipid peroksidasyonudur. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olurlar. Memeli hücre membranları peroksidatif hasara duyarlı olan fazla miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated fatty acids=PUFA) içermektedir. PUFA'nın oksidatif olarak yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinmekte ve hücre hasarının en güçlü nedenlerinden biridir. Kendiliğinden devam ettirilen zincir tepkimeler halinde ilerler ve oluşan membranda meydana hasar geri dönüşümsüzdür (80). Lipid peroksidasyonu, organizmada meydana gelen serbest radikaller aracılığıyla membran yapısı içerisinde bulunan PUFA zincirinin alfa –metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlanmaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sonucunda ortaklaşmamış bir adet elektron kalır ki bu da yağ asidi zincirinin radikal (karbon merkezli lipid radikali) olmasına neden olur. Meydana gelen bu lipid radikali (LR) kararsız bir bileşiktir ve bir takım değişikliklere uğrar. Molekül içinde bulunan çift bağların pozisyon değişimiyle konjuge dienler ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşimi sonucu lipid peroksil radikali (LOO) oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısında bulunan diğer PUFA'ları etkileyerek yeni radikallerin oluşumuna sebep olurken, kendileri ise açığa çıkmış hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüştürür. Böylelikle olay kendiliğinden katalizlenerek devam eder (81). Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar.

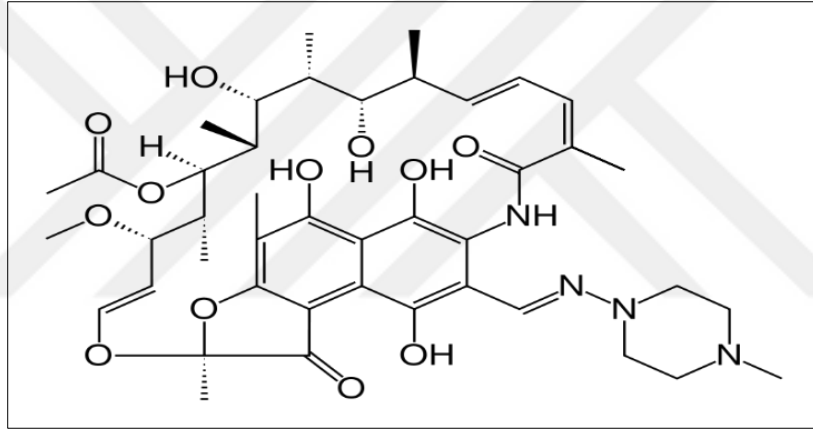
Plazma membranında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, gliserid ve steroller, okside olabilen aminoasit içeren transmembran proteinleri, mannitol, glukoz ve deoksi-şekerler serbest radikal ile meydana gelen hasara oldukça duyarlıdır. Hidroksil radikalinin (OH) membran lipidler ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonu başlatması reaksiyonlar içerisinde en önemli olanıdır. Poliansatüre lipidlerin oksidatif olarak yıkımı lipid peroksidasyon olarak tarif edilir (82). Bu yıkım, zincir halinde genişleyen bir reaksiyon olarak devam eder. Serbest radikallerde meydana gelen artış nöronal hücre, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonu reperfüzyon hasarına sebep olan en önemli nedendir. Lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asidlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizmasıdır.

Malondialdehit, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyon derecesi ile yakın ilişki gösterir. Bu sebeple biyolojik materyalde MDA ölçümü lipid peroksit düzeyinin göstergesidir (83). Belirttiğimiz gibi zararlı bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu hem direk olarak membran yapısına hem de indirek olarak reaktif aldehitler üretmek suretiyle diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir. Bu sayede hücre hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Lipid radikallerinin hidrofobik özellikte bulunması nedeniyle birçok reaksiyon membrana bağlı moleküller ile gerçekleşir. Böylece membranlarda, reseptörleri ve mebrana bağlı enzimleri inaktive ederek, membran geçirgenliği ve viskozitesini ciddi şekilde etkilerler. Ayrıca peroksidasyon sonucu meydana gelen MDA, membran komponentlerinin çapraz bir şekilde bağlanması ve polimerize olmasına sebep olur. Bu da membranda deformasyon, iyontransportunun bozulması, enzim aktivitesinin değişimi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyon gerçekleştirebilir ve bu yüzden mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (83).

2.10. Rifampisin

Rifampisin makrosiklik grubu antibiyotikler içinde yer alan ve tüberküloz tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Streptomyces mediterranei den üretilen yarı

sentetik bir antibiyotik olan rifampisin (3-[[[(4-methyl-1 piperazinyl)imino]methyl]-5,6,9,17,19,21-Hexahydroxy-23-methoxy 2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-8[N-(4-Methyl-1piperazinyl)formimidoyl]-2,7-poxypentadeca[1,11,13]trienimino) naphtha [2,1-b] furan-1,11-(2H)-dione-21-acetate [13292-46-1]), ana görevi serbest radikalleri yıkmasıdır. (Şekil 8) Birçok çalışmada rifampisin radikal yıkıcı etkisi gösterilmiştir. Rifampisin nöroprotektif etkisinin yanında glukokortikoid reseptör aktivasyonu da gösterilmiştir (13,14,15). Fokal serebral iskemide glukokortikosteroidlerin iskemi yaralanması ve reperfüzyon sonrası oluşan hasar üzerine gösterdikleri etki mekanizmasına benzer olarak rifampisin de glukokortikosteroid reseptörünü aktive ederek benzer şekilde etki yaptığı in vitro yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.



Şekil 8: Rifampisinin 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 Deneyleleri Yerel Etik kurulunun 29/03/2016 ve 8 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 (İSKEMİ+RİFAMPİSİN): 12 sıçandan oluşan bu gruba 30 dk bilateral karotis kliplemesi + hipotansiyon yapıldıktan sonra her gün rifampisin 30mg/kg 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 (İSKEMİ): 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 GRUBU): 7 rattan oluşan bu gruba sadece cilt laserasyonu yapıldı. 1.gün, 4.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda nörolojik muayeneleri yapıldı. 10.günün sonunda sakrifiye edildi ve beyin dokusu çıkarıldı.

GRUP 4 (PÜR KONTROL GRUBU): 7 rattan oluşan bu gruba sadece 15 dakika anestezi 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

İskemi+rifampisin 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.



Resim 1: Supine pozisyonunda paratrakeal alanların disseksiyonu

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



Resim 2: Sol A. Carotis Communitise Yaşargil klipi yerleştirilmesi

A. Carotis Communisler N. vagustan ayrıldıktan sonra Yaşargil anevrizma klibi yerleştirildi, (Resim 2).



Resim 3: Bilateral A. Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klibi yerleştirilmesi

Bilateral A. Carotis Communis'lere Yaşargil anevrizma klibi 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 4: Sütüre edilmesi

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



Resim 5: Sıçanların ayrı ayrı yerleştirilmesi

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



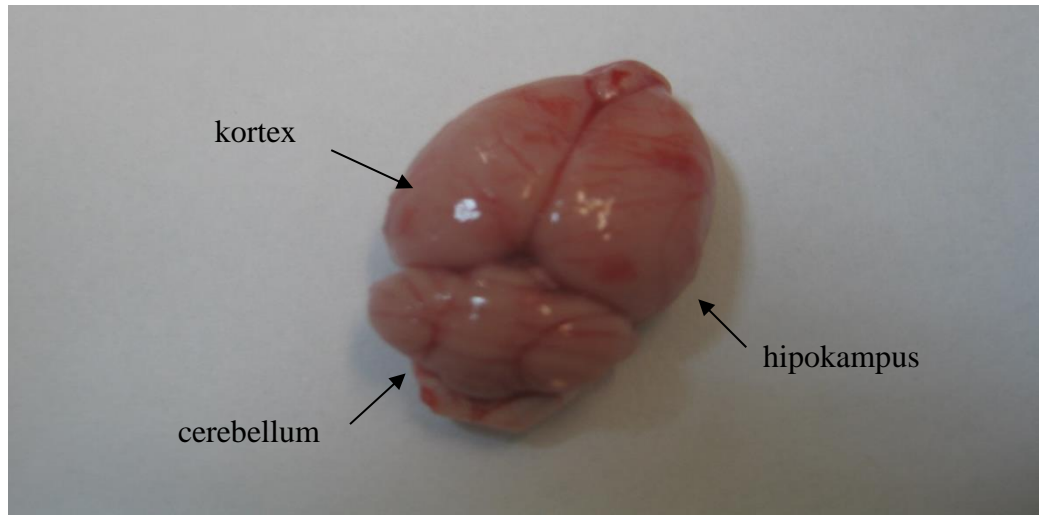
Resim 6: Sıçanlar besin ve suya ulaşabileceği ayrı ayrı yaşam alanları

Sıçanların aralıklı olarak (1, 4, 7 ve 10. günlerde) nörolojik muayeneleri yapıldı. 10 gün boyunca 30 mg/kg dozunda rifampisin hazırlanarak intraperitoneal olarak enjekte edildi.



Resim 7: Sakrifiye edilen ratların beyin dokusunun çıkarılması

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



Resim 8: Beynin Hipokampus, C. Striatum, Corpus Kallozum ve Talamus kısımlarının ayrılması

Beynin Hipokampus, C. Striatum, Corpus Kallozum ve Talamus kısmı ayrıldı (Resim 8). Biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

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 klibi 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.

Sham 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. 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 callozumve talamus kısmı ayrıldı ve biyokimyasal analiz için derin dondurucuda -76°C’de saklandı.

Pür 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. 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, 3.gün, 7.gün ve 10.gün sonunda (sacrifiye 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

MDA tespiti, Uchiyama ve Mihara yöntemleri üzerinde modifikasyon yapılmak suretiyle elde edilmiştir (84). MDA ölçüm metodunun temelinde, asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA tarafından oluşturulan molekül renginin 532 nm'deki absorpsiyon değerinin ölçülmesi işlemi esas alınmaktadır.

3.4.2. Doku MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) Doku homojenizasyon tamponu (0.01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH:7.4): 10 tane PBS tableti (Medicago, Uppsala, Sweden) içine yaklaşık 900 mL saf H₂O içeren beherde çözülür, hazırlanan çözelti pH değeri, pH metrede (Hanna Instrument, USA) 7.4 seviyesine ayarlanır. pH'sı ayarlanmış çözelti son hacim 1 L olacak şekilde tamamlanır.

2) % 1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H₃PO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA) koyulur ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanır.

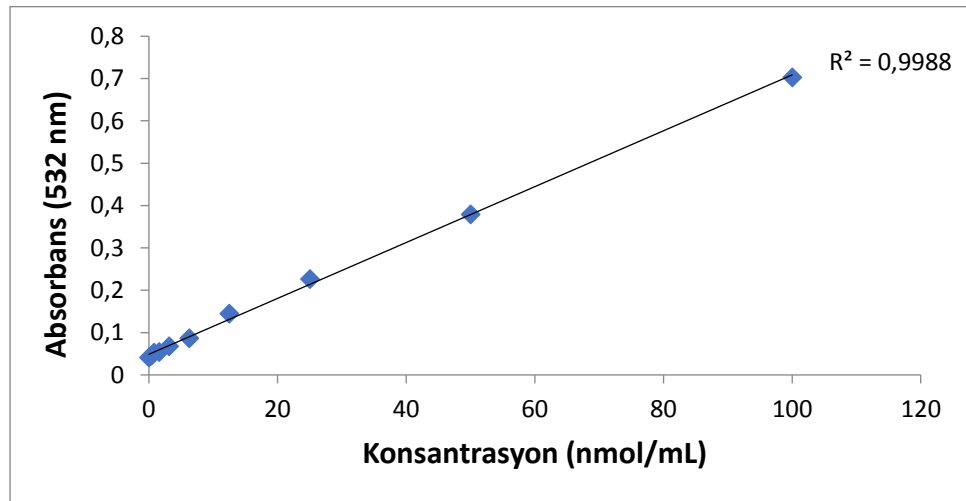
3) TBA çözeltisi: 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartıldı, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) eklenerek magnetik bar yardımıyla karıştırılarak çözülmesi sağlanır.

4) Standart çözeltiler: 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisine eklenir. Çözelti 50°C'de 1 saat bekletilir. Hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılır 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 hazırlanır.

Örneklerin Hazırlanışı: Dokudan alınan örneklerin her birinden yaklaşık 50 mg'lık kesimler yapılmıştır. Daha sonra hazırlana bu dokular 2 mL PBS içerisinde 9500 rpm (4x10s, 40°C)'de homejenizatör (Jane and Kunkel, Germany) ile homojenize edildi. Homojenatlar 4000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sayesinde elde edilen süpernatantlar 1:10 oranında PBS ile seyreltilip MDA ölçümü yapıldı.

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 eklendip karıştırıldıktan sonra 60 dakika kaynar suda bekletildi.
3. Bekleme süresi sonrası tüpler oda sıcaklığında soğumaya alındı ve sonrasında oda sıcaklığında 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonrası oluşan süpernatanttan 200'er µL alınıp 96 kuyucuklu pleytlere doldurulup mikropleyt okuyucu spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, USA) 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Elde edilen standart absorbans sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe geçildi ve MDA standart grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanılarak doku MDA miktarı nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 9: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.4.4. Plazmada Malondialdehit Tayini

Ratlardan alınan serum örnekleri biyokimyasal ölçümler yapılana kadar - 80°C’de muhafaza edildi. Serum örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi ortaya koyulan TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metoduyla tespit edildi (85). Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı rengin spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı. Tiyobarbitürikasit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri ayırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürülme işlemi yapıldı.

3.4.5. Serum MDA Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1) **0.084 N Sülfirik Asit (H₂SO₄):** 577 µL % 97’lik H₂SO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA)’den alınıp, deiyonize su ile hacim 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 yardımıyla karıştırılarak çözülme işlemi tamamlandı.

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 eklendi. Çözelti 50°C’de 1 saat bekletildi. 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 iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye alındı.

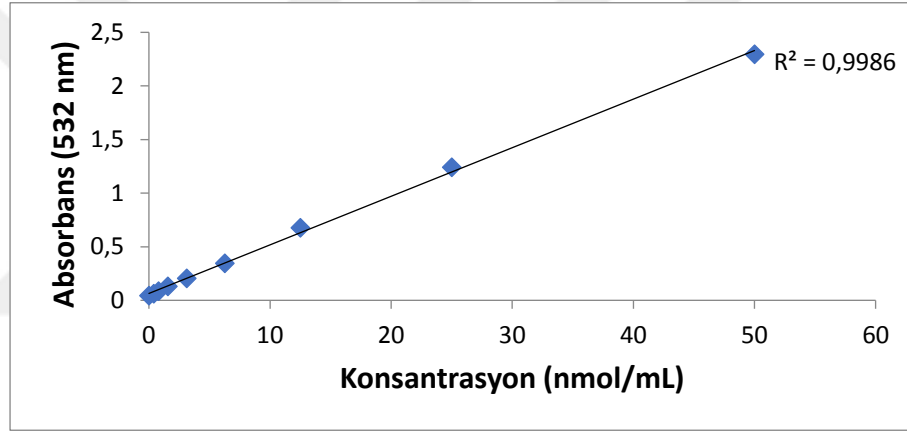
2. Karışımlar 1500 g’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazlar çıkarıldı.

3. Geriye kalan çökelek kısımları üzerine 2'şer mL saf su eklendikten sonra yeniden çözününceye kadar vortekslendi.

4. Tüplere 500'er µL TBA eklendi ve 1 saat 100°C'de bekletildi.

5. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

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 hazırlanmış oldu. Bu grafikten faydalanılarak serum MDA miktarı nmol/mL olarak hesaplandı (Şekil 10).



Şekil 10: Serum MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.6. Motor Muayene

Sıçanların 1., 4., 7. ve 10. günlerde Bederson skalasına göre motor muayene skor ortalamaları sunulmuştur (Tablo 5). Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerde motor skorlarına aşağıdaki tablodaki gibi puan verildi (Tablo 5).

Tablo 5: Bederson nörolojik muayene skalasına göre puanlama

Grade 0	Nörolojik defisit yok	5 puan
Grade 1	Ön bacaklarda flexiyon	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

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

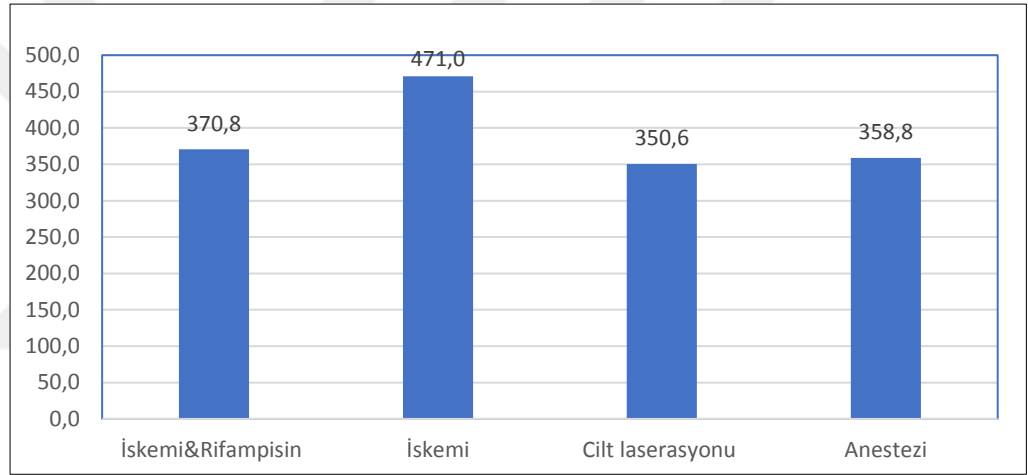
Verilerin analizi için bir istatistik paket programı kullanılmıştır.

Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum olarak verilmiştir. Normal dağılıma uygunluk için Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan parametrelerde gruplar arası karşılaştırma için ANOVA testi, normal dağılıma uymayan parametrelerde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi anlamlı çıkanlarda, ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

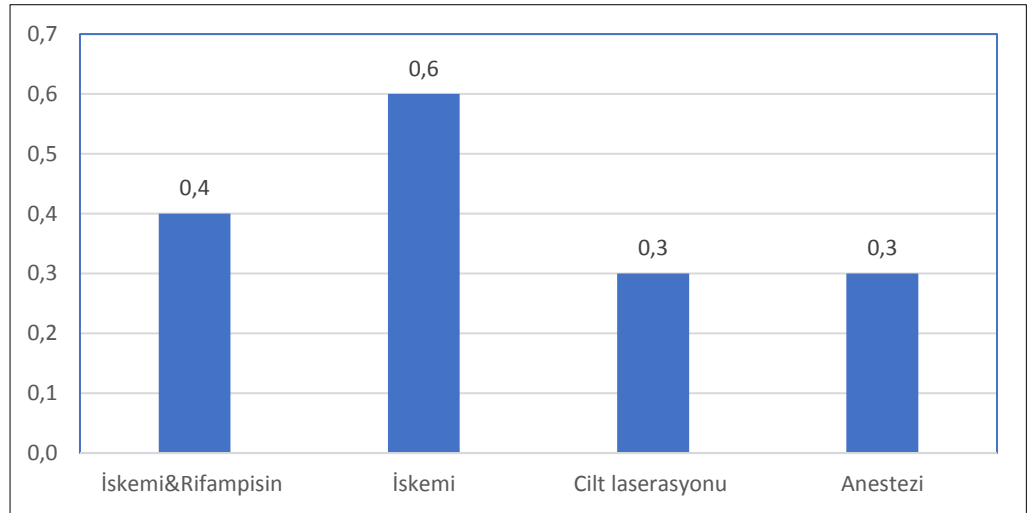
4. BULGULAR

Tablo 6: Gruplara göre doku MDA ve serum MDA ortalamaları

Grup	Doku Ortalama±Standart Sapma	MDA Serum Ortalama±Standart Sapma
Tüm gruplar (n=35)	399.3±127.3	0.4±0.2
İskemi&Rifampisin (n=10)	370.8±125.6	0.4±0.2
İskemi (n=12)	471.0±114.5	0.6±0.2
Cilt laserasyonu (n=6)	350.6±100.5	0.3±0.2
Anestezi (n=7)	358.8±140.9	0.3±0.2



Grafik 1: Doku MDA ortalamaları



Grafik 2: Serum MDA ortalamaları

Yapılan karşılaştırmada gruplar arasında doku MDA ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.112). Gruplar arasında serum MDA ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.033). Serum MDA ortalamaları arasında yapılan karşılaştırma sonuçları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 7: Grupların serum MDA ortalamalarının karşılaştırılması

Karşılaştırılan Grup		p değeri
İskemi	İskemi&Rifampisin	0.030
İskemi&Rifampisin	Cilt laserasyonu	0.588
Cilt laserasyonu	Anestezi	0.435
İskemi	Cilt laserasyonu	0.019
İskemi	Anestezi	0.035
Cilt laserasyonu	Anestezi	1.000

*p<0.0083 anlamlı olarak kabul edilmiştir

Araştırmaya katılan ratlarda (n:35) doku MDA ortalaması 399.3±127.3 ve serum MDA ortalaması 0.44±0.23 olarak bulunmuştur. İskemi+reperfüzyon grubunda doku MDA ortalaması 370.8±125.6 serum MDA ortalaması 0.41±0.20 olarak bulunmuştur. İskemi grubunda doku MDA ortalaması 471.0±114.6 serum MDA ortalaması 0.6±0.22 olarak bulunmuştur. Cilt laserasyonu grubunda doku MDA ortalaması 350.6±100.6 serum MDA ortalaması 0.32±0.20 olarak bulunmuştur. Anestezi grubunda doku MDA ortalaması 358.8±140.8 serum MDA ortalaması 0.37±0.21 olarak bulunmuştur.

Tüm gruplar arası yapılan doku MDA değerleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.(p=0.112)

Tüm gruplar arası yapılan *serum MDA değerleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.* (p=0.033)

İkili gruplar arası yapılan karşılaştırmada iskemi+rifampisin grubu ile iskemi grubu serum MDA değerleri arasında fark bulunmuştur.(p=0.030)

İskemi+rifampisin grubu ile cilt laserasyonu grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır.(p=0.58)

İskemi+rifampisin grubu ile anestezi grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır.(p=0.43)

İskemi grubu ile cilt laserasyonu grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmuştur.(p=0.019)

İskemi grubu ile anestezi grupları arasında serum MDA değerleri arasında fark bulunmuştur.(p=0.035)

Cilt laserasyonu grubu ile anestezi grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır.(p=1.00)

Tüm gruplar arası yapılan bederson motor skorlar arasında anlamlı fark tüm günlerde bulunmuştur. (Tablo 9)

İkili gruplar arası yapılan bederson motor skorlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 8: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson motor skorları

GRUP	1.GÜN	4.GÜN	7.GÜN	10.GÜN
İSKEMİ+RİFAMPİSİN	1	1	1	1
	1	1	1	1
	2	3	4	4
	2	3	4	5
	2	2	3	4
	5	5	5	5
	4	4	5	5
	2	3	4	5
	2	3	3	4
	3	3	4	5
	2	3	4	5
	2	3	4	5
İSKEMİ	2	2	2	2
	2	3	3	3
	2	2	2	2
	2	3	3	3
	2	2	2	2
	5	5	5	5
	2	3	2	2
	2	2	2	2
	2	2	2	3
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	4	4	4	4

	2	2	2	2
	2	3	3	3
SHAM	1	1	1	1
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
	5	5	5	5
PÜR KONTROL	4	5	5	5
	3	5	5	5
	4	5	5	5
	5	5	5	5
	4	5	5	5
	4	4	5	5
	3	4	5	5

Tablo 9: Grupların 1., 4., 7. ve 10. günlerdeki Bederson skorlarının 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.
İskemi+Rifampisin	2.33	1-5	2.8	1-5	3.5	1-5	4.08	1-5
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
p (<0.05)	<i>0.009</i>		<i>0.003</i>		<i>0.001</i>		<i>0.003</i>	

5. TARTIŞMA

Daha önce yapılan deneysel çalışma modellerinde beyin iskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisini incelemek ve terapötik yaklaşım seçeneklerini geliştirmek amacıyla sıklıkla bilateral a.carotis communis ligasyonu ve orta serebral arter ligasyonu kullanılmıştır. Bu sayede hipoksik ortamlar oluşturulmuş ve ortaya çıkan iskemiye dokunun cevabı araştırılmıştır. Bu çalışmalarda iskemi reperfüzyona hücresel cevap, nörotransmitter salınımı, iyon gradient bozuklukları, sitokinler gibi tetikleyici faktörlerin immünohistokimyasal cevapları değerlendirilmiştir (86).

İnmeyi takip eden süreçte meydana gelen beyin doku hasarı, asidotoksisite, eksitotoksisite, iyonik dengesizlik, oksidatif ve nitratif stres, infalamasyon ve apoptozis içeren çok sayıda kaskadın etkileşimi sonucunda oluşur (25). İskemi-reperfüzyon sırasında meydana gelen hasarı engellemek ve sonrasında ortaya çıkan hasarı yok etmek amacıyla glutamat reseptör antagonistleri, membran stabilizatörleri, kalsiyum kanal blokerleri, serbest radikal gidericileri, anti-inflamatuar, antiödem tedavi ve antiagregan ajanlar benzeri bir çok yöntem kullanılmaktadır (87).

Birçok çeşit hayvan üzerinde deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu deneysel modeller arasında en çok kabul gören model, sıçanlarda iki damar oklüzyonu + hipotansiyon modelidir. İki taraflı ana karotislerde geçici oklüzyon ve eş zamanlı olarak, kanın geri alınması yoluyla 50 mmHg düzeyinde hipotansiyon yapılır (50). Biz de çalışmamızda iki taraflı karotis klemplemesi + hipotansiyon modelini uygulayarak beyinde iskemi-reperfüzyon injürisi yaratarak daha önceki çalışmalarda nöroprotektif etkisi denenmiş olan rifampisini tercih ettik.

İskemide oluşan birbiriyle bağlantılı ve hızlı bir şekilde birbirini takip eden yolaklardaki eksitotoksisitenin erken ortaya çıkımında; Kalsiyum ve öteki iyonların hücre içine girmesi, hücresel ödem, intrasellüler kinaz ve proteaz enzimlerinin aktive olması, reaktif nitrosatif ve oksidatif ürünlerin fazla üretilmesi, hücre membran harabiyeti ve organel yetmezliği bulunmaktadır. Bunun sonucunda takip eden saatler içerisinde başlayan ve yavaş gelişen inflamatuvar yanıt oluşumunda yol açmaktadır. Bu durum Pselektin ve kemokinlerin, makrofaj ve nötrofillerin dokuya infiltre olmasını tetikleyen hücre içi adhezyon molekül-1'in (ICAM-1) ve endotelde bulunan adhezyon moleküllerinin up-regülasyonunu ile sonuçlanmaktadır. Sitoplazmada

kalsiyum artışı, mitokondri düzeyindeki elektron transport zincirinde inhibasyona sebep olur ve süperoksid anyonunun ortaya çıkmasını ve peroksinitrit oluşumunu destekleyen nitrik oksit sentezini de arttırmaktadır (37, 38). Bunun dışında endotelin salınımı, lökosit ve trombosit aktivasyonu, koagülasyon gecikmesi ve endotel fonksiyon bozukluğu patofizyolojik değişiklikler içerisinde bulunmaktadır (39). İskemi sonucunda oluşan glutamat salınımı artar, astrosit hücre fonksiyonu bozulur ve böylelikle astrosit hücreler aracılığıyla glutamat alınımı bozulur (24, 40, 41). Kalsiyum'un lipid peroksidasyonu, proteolitik enzimlerin aktivasyonu, serbest radikal üretimi, gen aktivasyonu benzeri mekanizmalar sonucunda, irreversible nöronal hasar artar (39).

Tüm bu etkilerin dışında kalsiyum, iskemi sonrasında hasar gören dokudaki damarlarda düz kas üzerine de etkilidir. Kalsiyumun bu etkisi sonucu damarlarda kasılma ve sonuçta da vazospazm gelişir. Benzer biçimde, serbest radikal üretimine katkı sağlayan araşidonik asit metabolizmasını başlatmaktır ve siklooksijenaz yolunun diğer ürünleri de serbest radikal üretimine katkıda bulunur. Plazma membranında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, gliserid ve steroller, okside olabilen aminoasit içeren transmembran proteinleri, mannitol, glukoz ve deoksişekerler serbest radikal ile meydana gelen hasara oldukça duyarlıdır. Hidroksil radikalının (OH) membran lipidler ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonu başlatması reaksiyonlar içerisinde en önemli olanıdır. Poliansatüre lipidlerin oksidatif olarak yıkımı lipid peroksidasyon olarak tarif edilir (82). Bu yıkım, zincir halinde genişleyen bir reaksiyon olarak devam eder. Bütün serbest radikal kaynakları tarafından stimüle edilebilen ve ortamda bulunan Fe veCu gibi transizyonel metaller sayesinde potansiyalize edilen lipid peroksidasyon plazma membranı ve hücre içi organellerde bulunan bir reaksiyondur. Bu reaksiyon yeni oluşan kimyasal serbest radikaller bitinedek devam eder. Reperfüzyon hasarının en önemli sebebi lipid peroksidasyonudur. Artan serbest radikaller lipid peroksidasyonunu başlatır ve peroksidasyon, nöronal hücre, plazma, organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ile myelinde görülür. İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturup denediğimiz rifampisinin etkisini lipid peroksidasyonun bir ürünü olan MDA'nın kan ve iskemik doku düzeylerini etkileyerek iskemi reperfüzyon injurisindeki etkisini göstermiştir. Rifampisinin nöroprotektif etkisinin yanında glukokortikoid reseptör aktivasyonu da

gösterilmiştir (13,14,15). Fokal serebral iskemide glukokortikosteroidlerin iskemi yaralanması ve reperfüzyon sonrası oluşan hasar üzerine gösterdikleri etki mekanizmasına benzer olarak rifampisin de glukokortikosteroid reseptörünü aktive ederek benzer şekilde etki yaptığı in vitro yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

İskemi sonrası görülen nöron ölümünde temel nedenlerden birisi ROS'a bağlı olanıdır. Dokudaki MDA düzeyi ROS'a bağlı oluşan hücre ölümünün belirteci olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda iskemi uygulamasıyla hipokampustaki doku MDA düzeyi anestezi ve sham gruplarına göre belirgin olarak yükselmiştir. Tüm bu etkiler altında rifampisin glukokortikosteroid reseptörlerini aktive ederek iskemi reperfüzyona bağlı hasarı ölçmek için kullanılan MDA düzeylerini azaltır. Bu özellik üzerinden yola çıkarak çalışmamızda doku ve serum MDA düzeyleri ölçülmüştür.

Bu deneysel çalışmada sham grubu ile anestezi gruplarının MDA düzeyleri birbirine çok yakinken, iskemi grubunun MDA düzeyinin belirgin olarak arttığı açık olarak ortaya çıkmıştır. İskemi + rifampisin grubunda doku ve plazmada MDA düzeyleri iskemi grubuna göre istatistiki olarak azalmıştır. Bu çıkan sonuç, iskemi sonrası doku MDA düzeylerinde yükselme olduğunun göstergesiydi. Tüm gruplar arası yapılan doku MDA değerleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.112$). Tüm gruplar arası yapılan serum MDA değerleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.033$). İkili gruplar arası yapılan karşılaştırılmada iskemi+rifampisin grubu ile iskemi grubu serum MDA değerleri arasında fark bulunmuştur. ($p=0.030$) İskemi+rifampisin grubu ile sham grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır($p=0.58$). İskemi+rifampisin grubu ile anestezi grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır($p=0.43$). İskemi grubu ile cilt laserasyonu grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır($p=0.019$). İskemi grubu ile anestezi grupları arasında serum MDA değerleri arasında fark bulunmuştur($p=0.035$). Sham grubu ile anestezi grupları serum MDA değerleri arasında fark bulunmamıştır($p=1.00$).

Bizim çalışmamızda grupların Bederson nörolojik muayene skorlamasına göre 1. günde, 4. günde, 7. günde ve 10. gündeki motor skoru açısından istatistiki anlamlı sonuç ortaya çıkmıştır. Bu farklılıklar iskemi + rifampisin ile anestezi,

iskemi + rifampisin ile sham grubu, iskemi ile sham, iskemi ile anestezi grupları arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. Bu da iskemi reperfüzyon yaralanması yapılan tüm gruplarda yeterli nörolojik defisit olması ile açıklanmaktadır. Rifampisin uygulanan grupta motor skorun sham grubuna yaklaştığı, nörolojik iyileşmenin iskemi uygulanan gruba göre daha iyi olduğunun bir göstergesi olarak yorumlandı. Yine iskemi grubuyla iskemi+rifampisin grubunun nörolojik muayene skorlamasıyla, biyokimyasal olarak gruplar arası serum ve doku MDA değerlerinin Bederson skalası'nı destekler şekilde sonuç ortaya çıkarması, rifampisin'in iskemi reperfüzyon yaralanmasında tedavi edici değerinin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.



6. SONUÇ

Ratların deneysel beyin iskemi ve reperfüzyon injurisinde rifampisinin etkileri adlı çalışmamızda; bilateral karotis arter kliplenmesi ve intrakraniyal kan alınması sonucu hipotansiyon yapılarak ratlarda serebral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturuldu. Sınıflandırılan gruplar arasında yaptığımız karşılaştırmada, değişik derecelerde nörolojik hasar olduğu görüldü. Serebral iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkinliği araştırılan rifampisinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Sonuç olarak rifampisinin serebral iskemi reperfüzyon yaralanmasının önlenmesinde, uygun doz ve sürede kullanılması sonucu ortaya çıkan iyileşme, rifampisinin nöroprotektif etkisinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Üçüncü H. Sıçanların deneysel beyin iskemi ve reperfüzyon yaralanmasında klotrimazol'un etkileri(tez). Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2011.
2. Ropper AH, Brown RH. Serebrovasküler hastalıklar. Çoban O, Bebek N [Çeviri editörleri]. 8. baskı, Ankara: Güneş Kitapevi; 2006.
3. Kumral E, Balkır K. İnme epidemiyolojisi. In: Balkan S, editör. Serebrovasküler hastalıklar. 1. baskı, Ankara: Güneş Kitapevi; 2002. s. 38-40.
4. Lewandowski C, Barsan W. Treatment of acute ischemic stroke. *Ann Emerg Med* 2001;37:202-16.
5. Onat A., Keleş İ, Çetinkaya A, ve ark. On Yıllık TEKHARF Çalışması Verilerine Göre Türk Erişkinlerinde Koroner Kökenli Ölüm ve Olayların Prevalansı Yüksek. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2001; 29:8-19.
6. Know the Facts, Get the Stats: Our Guide to Heart Disease, Stroke and Risks. Dallas, Tex: American Heart Association; 2002. Publication No. 55-0576 2002-04.
7. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics—2006 Update. Dallas, Tex: American Heart Association.
8. Prencipe, M et al, Long Term Prognosis After a Minor Stroke, 10-Year Mortality and Major Stroke Recurrence Rates in a Hospital-Based Cohort, *Stroke*, 1998;29:126-132.
9. Biller, J, Love, B, Ischemic Cerebrovascular Disease, in Bradley, WG et al. (eds.), *Neurology in Clinical Practice Third Edition*, Butterworth-Heinemann, 2000;1125-1166.
10. Ay H, Dalkara T. İskemik penumbra ve terapötik zaman aralığını belirleyen faktörler. Balkan S. (Editör) *Serebrovasküler Hastalıklar*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2005:29-37.
11. Hall ED: The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*, 76: 13-22, 1992.
12. Eklof B, Siesjö B: The effect of bilateral carotid ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 86: 155-165, 1972.
13. Yulug B, Kilic U, Kilic E, Bähr M (2004) Rifampicin attenuates braindamage in focal ischemia. *Brain Res* 996: 76-80.
14. Calleja C, Pascussi JM, Mani JC, Maurel P, Vilarem MJ (1998) The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. *Nat Med* 4: 92-96.
15. Arslan E, Cakir E and Eminagaoglu MS (2014) Effects of Rifampicin on Experimental Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury in Rats *J Spine* 3: 167.
16. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1269–1276.

17. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological process in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurol Neurosurg.* 2009; 111:483-495.
18. Mazzoni P, Rowland LP (Çeviri: M. Özmenoğlu). *Merritt's Nöroloji El Kitabı.* Ankara: Güneş Kitabevi; 2003:121-55.
19. Anderson WAD, Kissane JM: *Anderson Patoloji (Çev. A. Kaancıgil) Güven Yayınları,* 1982, 262-267.
20. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I: Pathophysiology, *J Neurosurg.* 1992; 77:169-184.
21. Witte O, Bidmon HJ, Schiene K. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20: 1149-1165.
22. Stephan GW, Bruce RR: Hypoxic-ischemic injury of the white matter. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management.* Chapter 11, 1998.
23. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992
24. Mehta SL, Manhas N, Raghbir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007;54:34-66.
25. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008;55:310-318.
26. Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol.* 2004; 15:3-12.
27. Modo M, Sowinski P, Hodges H. Conditional discrimination learning in rats with global ischaemic brain damage. *Behavioral Brain Research* 2000; 111: 213-21.
28. Tator CH: Pathophysiology and Pathology of spinal cord injury. Wilkins RH, Rengachary SS (eds) in *Neurosurgery, Vol 2* New York, Mc Graw Hill, 1996: 2847-2859.
29. Ceylan S, Kalelioğlu M, Aktürk G: Medical treatment of acute spinal cord injuries. *Res Exp Med,* 190: 111-119, 1990.
30. Qui W, Shen H, Zhang Y, et al. Noninvasive selective brain cooling by head and neck cooling is protective in severe traumatic brain injury. *J Clin Neuroscience* 2006;13:995-1000.
31. Navarro RCE. Metabolismo cerebral en isquemia. En: Velez AH, Rojas MW, Borrero RJY, Restrepo MJ. Eds. *Fundamentos de medicina. Neurología.* Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia 1991.
32. Buchan A. Advances in cerebral ischemia: experimental Approaches. *Neurol Clinics* 1992; 10:49-61.
33. López-Hernández EM, Solís H Cerebral ischemia: some secondary alterations and animal models. *Arch Neurocién (Mex)* 2005; 10: 160-1167.

34. Pendlebury ST, Giles MF, Rothwell PM Pathophysiology of acute cerebral ischemia.. Transient Ischemic Attack and Stroke. Cambridge University Press pp.49-54, 2009.
35. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Res Brain Res Rev. 2002; 39:55-73.
36. Bambal G., Kalaycı G., Ekici F. Serebral İskemi Oluşum Mekanizmaları Tıp Araştırmaları Dergisi; 2015: 13(1):36-43
37. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3:214–220.
38. Bull R, Finkelstein JP, Gálvez J, Sánchez G, Donoso P, Behrens MI, Hidalgo C. Ischemia enhances activation by Ca²⁺ and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. J Neurosci. 2008; 28:9463-9472.
39. Gupta YK, Briyal S. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol. 2004; 48:379-394.
40. Budd, S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. Pharmacol. Ther.1998; 80, 203–229.
41. Mori, T., Tateishi, N., Kagamiishi, Y., Shimoda, T., Satoh, S., Ono, S., Katsube, N., Asano, T., 2004. Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-250696. Neurochem. Int. 45, 381–387.
42. Clark A.W., Krekoski C.A. Bou SIncreased geletinase A (MMP-2) and geletinase B (MMP-9) activities in human brain after focal cerebral ischemia. Neurosci Lett.1997: 238: 53-56.
43. White JM. Sullivan B.C., DeGracia DJ., O’Neil BJ., Neumar RW., Grossman LI., Rafols JA., Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Journal of the Neurological Sciences. 2000;179: 1-33.
44. Nakase H, Heimann A, Uranishi R, Riepe MW, Kempfski O. Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor. Neurosci Lett 290(2): 105-108, 2000.
45. Hayashi T., Abe K., Suziki H., Itayama Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke.1997; 28:2039-2044.
46. Abe K.Therapeutic potential of neurotropic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.2000; 20:1393-1408.
47. Block F. Global ischemia and behavioural deficits. Prog Neurobiol. 1999 Jun;58(3):279-95. Review. PubMed PMID: 10341364.
48. W.A. Pulsinelli, J.B. Brierley, A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, Stroke 10 (1979) 267– 272.

49. M.L. Smith, G. Bendek, N. Dahlgren, I. Rosen, T. Wieloch, B.K. Siesjo, Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model, *Acta Neurol. Scand.* 69 (1984) 385–401.
50. Yanagihara T. Experimental stroke in gerbils: Correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. *Stroke* 1978; 9:155–159.
51. Kirino, T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippo-campus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57±69.
52. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(3): 472-6.
53. Balkan S. Serebrovasküler Anatomi. Balkan S. (Editör) Serebrovasküler Hastalıklar. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2005:1-14.
54. Junqueira LC, Carneiro J. Sinir Dokusu ve Sinir Sistemi. In: Aytekin Y, Solakoglu S, editors. *Temel Histoloji*. 10. basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2006; 161-189.
55. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. Second Edition: Philadelphia: WB Saunders Co, 2001; 183-217.
56. Paker S. *Histoloji*. 2. Baskı. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990; 187-203, 439-444
57. Snell RS. *Klinik Nöroanatomi*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000; 48-299
58. Barr ML, Klernam JA. *The Human Nervous System*. (5th ed). Philadelphia: JB Lippincott Comp 1988; 266–9.
59. Clarke PGH. Developmental cell death, morphological diversity, and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 1990; 181: 195–213.
60. Greenberg MS. *Handbook of Neurosurgery*. Cerebral arterial anatomy. Sixth edition. USA: Thieme; 2006.
61. Jianping S: Ischemia, reperfusion and no-reflow phenomenon. Svensson LG, Crawford ES, eds. *Cardiovascular and vascular disease of the aorta*. U.S.A. W.B. Saunders Company. P: 194-218, 1997.
62. Krause GS, White BC, Aust SD, et al: Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Critical Care Med*, 16: 714-26, 1988.
63. Ransom BR, Walz W, Davis PK, Carlini WG: Anoxia induced changes extracellular K⁺ and pH in mammalian central white matter. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12: 593-602, 1992.
64. Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
65. Choi DW: Calcium specific mediated neurotoxicity: Relationship to channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 11: 465-469, 1988.

66. Liang D, Dawson TM, Dawson VL. What have Genetically Engineered Mice Taught Us About Ischemic Injury? *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:205.
67. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death. *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:193-205.
68. Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Current Medical Research and Opinion*. 2002; 18:9-13.
69. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, et al. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin*. 1998;46(4):281-309
70. Kristián T, Siesjö BK. Calcium in Ischemic Cell Death. *Stroke*. 1998; 29:705-718.
71. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death. *Current Molecular Medicine*. 2004; 4:193-205.
72. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*. 1999; 79(4):1431-1568.
73. Slater TF: Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem*, 222: 1-15, 1984.
74. Abdollahi M, Ranjbar A, Sihadnia S, Nikfar S, Rezaie A: Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, 10: 141-147, 2004.
75. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res*. 2004; 153(1):77-86.
76. Austin GE, Lam L, Zaki SR, Chan WC, Hodge T, Hou J. Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5' flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells. *Leukemia* 1993; 7:1445-1450.
77. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: occurrence and biological function. Everse J, Everse KE, Grisham MB, editors. *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Boca Raton, FL.; CRC Press, Inc., 1991; 1:1-35.
78. Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1991;10:201-9.
79. Trush MA, Seed JL, Kensler TW. Oxidant-dependent metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by phorbol ester-stimulated human polymorphonuclear leukocytes: possible link between inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 5194-5198.
80. Onat T, Emerk K, Sözmén EY. İnsan biyokimyası. 1. Baskı, Ankara 2002: Palme Yayıncılık.
81. Fridovich I: The Biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-81.

82. Tamer L, Polat G, Eskandari G., Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. MEÜ Tıp Fak Derg 2000;1(1):52-58.
83. Machlin JL, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. Fasebj 1987;1:441-445.
84. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 86: 271-278.
85. Yagi K (1984). Assay of blood plasma or serum. Methods of Enzymology 109: 328-331.
86. Xu XH, Zhang SM, Yan WM, et al. Development of cerebral infarction, apoptotic cell death and expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein following focal cerebral ischemia in rats. Life Sciences. 2006; 78:704-712
87. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2003; 27(2):267-282.
88. Kıyan S, Öz Saraç M, Ersel M, Aksay E, Yürüktümen A, Musalar E, Çevrim Ö, Retrospective Analysis of 124 Acute Ischemic Stroke Patients Who Attended To The Emergency Department In One Year Period Akademik Acil Tıp Dergisi 2009, Cilt:8 Sayı: 3.