

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

İSKEMİK SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-9 AKTİVİTESİNİN BİR RİSK VE
PROGNOSTİK FAKTÖR OLARAK ÖNEMİ

UZMANLIK TEZİ

Dr.VİLDAN ALTUNAYOĞLU

TRABZON – 2005

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

İSKEMİK SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ-9 AKTİVİTESİNİN BİR RİSK VE
PROGNOSTİK FAKTÖR OLARAK ÖNEMİ

THE MATRIX METALLOPROTEINASE-9 ACTIVITY AS A RISK
AND PROGNOSTIC FACTOR IN ISCHEMIC CEREBROVASCULAR
DISEASE

UZMANLIK TEZİ

Dr.VİLDAN ALTUNAYOĞLU



TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR.SİBEL VELİOĞLU

TRABZON – 2005

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçiminde ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mehmet ÖZMENOĞLU'na, tezim planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi konusunda büyük katkı ve desteğini görmüş olduğum tez danışman hocam Doç. Dr. Sibel VELİOĞLU'na, çalışma boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen sayın Doç.Dr. Zekeriya Alioğlu ve Doç.Dr. Cavit BOZ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde aktif katkı ve desteğini görmüş olduğum biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Caner Karahan, araştırma görevlilerinden Dr. M. Selçuk Eminağaoğlu ve Dr. Hülya Yılmaz'a ve sonuçların istatistiksel hesaplanmaları ve yorumları konusunda katkı ve fikirleri ile beni aydınlatmış olan sayın Doç. Dr. Gamze Çan'a ayrıca teşekkür ederim.

Dr. Vildan Altunayoğlu

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	6 - 7
2. GENEL BİLGİLER	
1 – Serebrovasküler Hastalıklar	8 - 16
2 – Matriks Metalloproteinazlar	17 - 21
3 – Matriks Metalloproteinazlar ve Santral Sinir Sistemi	22 - 28
3. MATERYAL VE METODLAR	29 - 37
4. BULGULAR	38 - 54
5. TARTIŞMA	55 - 67
6. SONUÇLAR	68 - 69
7. ÖZET	70 - 71
8. İNGİLİZCE ÖZET	72 - 73
9. KAYNAKLAR	74 - 88

KISALTMALAR

MMP: Matriks Metalloproteinaz

MMP-9: Matriks Metalloproteinaz-9

MMP-2: Matriks Metalloproteinaz-2

TIMP: Tissue inhibitors of metalloproteinases

Metalloproteinazların doku inhibitörleri

ESM: Ekstraselüler matriks

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

MRS: Modified Rankin Scale

BBT: Bilgisayarlı Beyin Tomografisi

MRI: Magnetic Resonance Imaging

SVH: Serebrovasküler hastalık

SSS: Santral sinir sistemi

DM: Diabetes Mellitus

HT: Hipertansiyon

KAH: Koroner arter hastalığı

AF: Atriyal fibrilasyon

TİA: Geçici iskemik atak

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

Hb: Hemoglobin

Htc: Hematokrit

EKG: Elektrokardiografi

TNF: Tümör nekrotizan faktör

MCA: Orta (middle) serebral arter

rtPA: İntravenöz rekombinant doku plasminojen aktivatorü

KBB: Kan beyin bariyeri

GİRİŞ

Matriks metalloproteinazlar (MMP) normal şartlar altında ekstraselüler matriksi yapılandıran ve patolojik olarak nöroinflamatuvar cevabın bir parçası olarak substratlara saldıran, çinkonun bağlandığı bir proteolitik enzimler grubudur. MMP'lar embriyo gelişimi, kemik oluşumu, yara iyileşmesi, angiogenez, ovulasyon, implantasyon gibi birçok fizyolojik doku yapılanma prosesine iştirak etmektedir. Fakat, MMP'ların kontrol edilemeyen ekspresyonu doku hasarı ve inflamasyon ile sonuçlanabilir.

Son yıllarda anormal MMP aktivitesinin serebral iskemiyeye katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. MMP enzim ailesinden olan MMP-2 (72 kDa, geletinase A) ve MMP-9 (92 kDa, geletinase B), spesifik olarak serebral kan damarlarının etrafında bulunan basal laminanın ana komponentlerinden olan tip IV kollojeni, laminini ve fibrinoktini parçalamaktadırlar. Hayvan modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda ve serebrovasküler hastalık geçirmiş hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, MMP-2 ve MMP-9'un iskemik olaydan sonra erken olarak arttığı gösterilmiştir. Ayrıca MMP inhibitörleri ve MMP nötralize edici antikorlar ile tedavinin vazojenik ödem oluşumunu ve infarkt hacmini azalttığı fare modellerinde gösterilmiştir. Ek olarak; MMP-9'dan yoksun bırakılmış sıçanlarda normal olanlara göre daha az iskemik hacim tespit edilmiştir. Bu gibi sonuçlar ile MMP ailesinin serebral iskeminin patofizyolojisinde rol aldığı ileri sürülmektedir.

Serebrovasküler Hastalıklar (SVH), koroner arter hastalığı ve kanserden sonra üçüncü en sık ölüm nedenidir. SVH'lar, nöroloji pratiğinde en sık karşılaşılan hastalık gruplarından biridir ve ortaya çıkması yaş ile artmaktadır. Her yıl, her 1 milyonda 2000 kişi SVH geçirmektedir ve bu hastaların üçte biri bir yıl içinde kaybedilmekte, yaklaşık üçte-ikisi ise çeşitli derecelerde sakat kalmaktadır. Son yıllarda SVH'a neden olan durumların medikal tedavilerindeki gelişmeler ile strok insidansında bir azalma olmakla birlikte halen ilerleyen yaş ile genişleyen bir popülasyonu etkilemekte, iş gücü ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Serebrovasküler hastalıklara yaklaşımda; önleyici tedaviler yanı sıra SVH'larda erken dönem medikal tedavi yöntemlerinin de önemi büyüktür. Akut dönemde yapılabilecek tedavilerdeki gelişmelerin SVH'lara bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltmada etkili olacağı açıktır.

SVH'ların önemli bir bölümünü iskemik SVH'lar kapsamaktadır. İskemik SVH'lar beyin damarlarında meydana gelen tıkanmalar sonucu serebral fonksiyonların

fokal yada global olarak hızlı bir şekilde bozulmasıdır. Serebral metabolizmanın oksijen ve glukoza bağımlı olması nedeni ile serebral iskemi sonucu nöronal hasar gerçekleşir. Nöronal ölüme giden proses içinde bazı basamaklar geri dönüşümsüz olmayıp, erken müdahaleler sonucu durdurulabilir ve iyileşme sağlanabilir.

Bu çalışmada, akut, subakut, kronik dönemde iskemik SVH'larda MMP-9 aktivitesi saptanarak, MMP-9 aktivitesinin iskemin SVH şiddeti ve prognozu açısından önemini saptamak amaçlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçların iskemik SVH tedavisinde güncel yaklaşımlara ışık tutacağı ve yeni tedavi yöntemleri gelişimine katkıda bulunacağını umuyoruz.

GENEL BİLGİLER

SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR

Serebrovasküler hastalık (SVH), intrakranial damarları etkileyen patolojik bir proses sonucu, beynin belli bölge veya bölgelerinin hasara uğraması durumudur. SVH'a neden olan patolojik proses, damar lümeninin trombus yada emboli ile tıkanması, damar duvarının yırtılması, damar duvarının geçirgenliğini değiştiren her hangi bir durum, kan viskozitesinin artması yada kanın kalitesindeki her hangi bir değişkenlik olabilir. Patolojik proses; tromboz, emboli, diseksiyon, damar ruptürü gibi görünen yönü ile adlandırılabilceği gibi primer hastalığa işaret eden; aterosklerozis, hipertansif aterosklerotik değişiklikler, arterit, anevrizmal dilatasyon ve gelişimsel malformasyon gibi daha temel ifadelerle de açıklanabilir. SVH, arkasında yatan neden her ne olursa olsun presentasyonu oldukça niteleyici olan bir durumdur ve ani gelişen, konvülsif olmayan, fokal nörolojik defisit olarak tanımlanır (1).

SVH'lar giderek büyüyen halk sağlığı problemi olup, tüm dünyada önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Batı ülkelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar yılda 2000/milyon kişinin SVH geçirdiği ve 666/milyon kişinin SVH nedeni ile öldüğünü göstermektedir (2, 3). Bu tespit SVH'ları, akut koroner sendrom ve maliniye bağlı ölüm sonrasında üçüncü en sık ölüm nedeni yapmaktadır. Tüm dünya genelinde ise inme her yıl 50.5 milyon ölümün 4.4 milyonu (%9'unu) kapsayarak iskemik kalp hastalığından sonra ikinci sırada ölüm nedenidir (4, 5). SVH sonrası yaşayan 1300/milyon kişinin en az yarısında inmeden dolayı sekel kalmaktadır ve bu oran inmeyi sakatlığa, bağımlılığa neden olan hastalıklar arasında birinci sıraya koymaktadır (3, 6, 7).

SVH'lar temel olarak iki gruba ayrılırlar:

1- İskemik serebrovasküler olaylar

İnfart ile birlikte yada infarktsız olabilir. İskemik serebrovasküler olay, sıklıkla serebral arterlerin trombus yada emboli ile tıkanması ile oluşur. Kan sirkülasyonunun bozulması, kardiyak yetmelik yada şok sonucu oluşan hipotansiyon şayet yeterince uzun ve ağır ise fokal yada yaygın serebral iskemiye neden olabilir.

2- Hemorajik serebrovasküler olaylar

Sıklıkla küçük arterler olmak üzere serebral arterlerden sızan kan direkt olarak beyin içinde birikerek hematoma neden olabilir, ventriküllere ve subaraknoid mesafeye geçebilir. Kanama durduğunda ise hematom haftalar yada aylar içinde resorbe olarak kaybolur. Pıhtılaşmış kanın kitle etkisi ile beyin dokusu ve intrakranial basınçta değişik yaparak fiziksel hasara neden olurlar.

İSKEMİK SEREBROVASKÜLER HASTALIK

İskemik SVH beyin belli bölgesine serebral kan akımının engellendiği durumlarda gelişir. Bütün SVH'ların yaklaşık %80-85 gibi önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İskemik SVH'nın sınıflandırılması bir çok çalışmanın konusu olmuştur (8, 9, 10, 11, 12). Buna rağmen belli tanımlamalara ulaşmak ve bunları bireysel olarak hastaların teşhisinde kullanmak oldukça zor olmaktadır. Günümüzde, iskemik inmenin etiolojisinin prognoz, sonuç, ve yaklaşımı etkilediğinin gösterilmesi nedeni ile iskemik SVH'lar etiolojilerine göre sınıflandırılmışlardır (13),(Tablo-1).

Tablo - 1 İskemik İnme Sınıflandırması (Adams ve ark.)

- | | |
|----|--|
| 1. | Geniş arter ateroskleroza (emboli/trombüs) |
| 2. | Kardiyoembolik (yüksek-risk/orta-risk) |
| 3. | Küçük damar oklüzyonu (lakünler) |
| 4. | Diğer belirlenememiş nedenlere bağlı inme |
| 5. | Nedeni belirlenememiş inme |
| | a. Belirlenmiş iki yada daha fazla neden |
| | b. İnceleme yapılmamış olma durumu |
| | c. Yetersiz inceleme |

1- Geniş arter ateroskleroza (emboli/trombüs):

Bu tip iskemik inme hemen daima serebrovasküler ateroskleroz için risk faktörleri olan hastalarda olur. Ateroskleroz bir çok faktöre bağlı, komorbiditelerin üst üste geldiği, risk faktörlerinin bir birine eklendiği bir durumdur. Ateroskleroz için risk faktörleri değiştirilebilenler ve değiştirilemeyenler olarak iki başlık altında toplanabilir.

Tablo-2: İskemik SVH için risk faktörleri

Değiştirilemeyenler	Değiştirilebilenler
Yaş	Hipertansiyon
Cinsiyet	Geçici iskemik ataklar
İrk	Strok öyküsü
Aile öyküsü	Asemptomatik karotid üfürümü /stenoz
Genetik	Kalp hastalığı
	Aort ark ateromatozu
	Diabetes mellitus
	Dislipidemi
	Sigara alışkanlığı
	Alkol tüketimi
	Artmış fibrinojen
	Artmış homosistein
	Düşük serum folat seviyesi
	Artmış antikardiyolipin antikorları
	Oral kontraseptif kullanımı
	Obesite

Geniş arter aterosklerotik SVH, sıklıkla plak komplikasyonlara bağlı olarak ülserasyon sonrası arterden artere embolizasyon yada tromboza bağlı stenoz sonrası gelişir. Tromboz sıklıkla proksimal karotid , distal vertebral arter ve alt, orta basiller arterde oluşur (14).

Geniş arter aterosklerotik inmede beynin ana arterlerinden yada kortikal arter dallarından birinin %50'den daha fazla tıkalı olduğunu gösteren görüntüleme ve klinik bulgular vardır. Klinik bulgular; afazi, neglekt, belli bölge ile sınırlı motor tutulum gibi serebral kortikal bozuklukları yada beyin sapı, serebellar disfonksiyon bulgularını içerebilir. Öyküde klaudikasyon, aynı arter trasesinde geçici iskemik atak olması, karotid üfürümü yada azalmış nabız tespit edilmesi klinik teşhisi destekler. Kortikal yada serebellar lezyonlar ve 1.5cm'den daha büyük çapı olan beyin sapı, subkortikal hemisferik infaktlar potansiyeller olarak geniş arter aterosklerotik kaynaklı olarak

düşünülür. Destekleyici kanıt olarak, doopler görüntüleme yada arteriografi ile ekstrakraniyal yada intrakraniyal arterde %50'den fazla stenoz gösterilmesi gerekir. Diagnostik çalışmalar ile kardiyojenik emboli kaynağı ekarte edilmelidir (13).

2- Kardiyembolizm

Serebrovasküler hastalık, çeşitli kalp hastalıklarının komplikasyonu olarak görülebilir ve ciddi morbidite ve mortaliteye neden olurlar. Kardiyak embolizme bağlı inme iskemik inmelerin %15-20'sini kapsar. Kardiyak emboli trombosit, fibrin, trombosit-fibrin, kalsiyum, mikroorganizma yada neoplastik parçalardan oluşabilir (14). Kardiyak emboli kaynakları emboli yapma eğilimlerine göre yüksek ve orta riskli olarak gruplandırılırlar (14), (Tablo-3).

Tablo-3: TOAST sınıflandırmasına göre yüksek ve orta riskli kardiyak emboli kaynakları

Yüksek riskli kaynaklar	Orta riskli kaynaklar
Mekanik prostetik kalp kapakları	Mitral kapak prolapsusu
AF ile mitral stenoz	AF olmaksızın Mitral stenoz
AF	Mitral anulus kalsifikasyonu
Sol atriyal/atriyal apendiks trombusü	Sol atriyal türbülans
Hasta sinus sendromu	Atriyal septal anevrizma
Yeni geçirilmiş MI (<4 hafta)	Patent foramen ovale
Sol ventrikül trombozu	Atriyal flutter
Dilate kardiyomyopati	Lone AF
Akinetik sol ventrikül segmenti	Biprostetik kardiyak kapak
Atriyal miksona	Nonbakteriyal trombotik endokardit
İnfektif endokardit	Konjestif kalp yetmezliği
	Hipokinetik sol ventrikül
	MI (>4 hafta, <6 ay)

Kardiyoembolik inme teşhisi için en az bir kardiyak emboli kaynağı gösterilmelidir. Klinik ve beyin görüntüleme bulguları geniş arter aterosklerotik inmeye benzerdir. Öyküye birden fazla vasküler alanda TIA yada inme öyküsü klinik teşhisi destekler. Tromboembolizm için potansiyel geniş arter ateroskleroz kaynakları dışlanmalıdır. Orta riskli kaynağı olan inmeli hastalarda SVH için diğer nedenler yoksa muhtemel kardiyoembolik inme olarak sınıflandırabilirler.

3- Küçük arter oklüzyonu (lakün)

Hastalar lakunar sendromlardan birini geçirmek zorundadır ve kortikal disfonksiyon olmamalıdır. Hipertansiyon yada diabetes mellitus öyküsü olması tanıyı destekler. Hastalar ayrıca normal BBT/MR görüntülemesi vardır yada büyüklükleri 1,5 cm'den küçük subkortikal hemisferik lezyonlar vardır. Kardiyak embolizasyon kaynağı ekarte edilmelidir ve ipsilateral ekstrakranial arterlerin görüntülemesi 50%'den fazla darlığı göstermemelidir.

4- Diğer belirlenememiş nedenlere bağlı inme

Bu grup nonaterosklerotik vaskülopati, hiperkuagabl durum, yada hemotolojik hastalıklar gibi diğer nadir nedenlere bağlı inmeli hastaları içerir. Bu grupta hastalar, akut iskemik inmeyi gösteren kranial görüntülemeye sahip olmaları gerekir. Tetkikler ve radyolojik görüntüler, kan tahlilleri nadir nedeni ortaya koymalı ve embolizm geniş arter aterosklerotik nedenleri ekarte edilmelidir.

5- Nedeni belirlenememiş inme

Bazı durumlarda inme nedeni güvenilir bir şekilde kararlaştırılmaya bilinir yada geniş ve ileri tetkiklere rağmen bazı hastalarda belirli bir etioloji olmayabilir. Bazı hastalarda değerlendirme yetersiz olabilir. Ayrıca bazı hastalardan birden fazla neden olup inmenin hangisine bağlı olarak geliştiğine karar verilemeye bilinir.

SEREBRAL İSKEMİNİN PATOFİZYOLOJİSİ

Serebral infarktından sonraki mikroskopik değişiklikler iyi dokümanite edilmiştir. İnfarktın yaşına göre değişiklikler gözlenir. Değişiklikler infarkt hemen sonra gözükmeyip 6 saat kadar gecikebilir. Başlangıç olarak nöronal şişme vardır ve hemen takibinde çekme, hiperkromazi (pigmentli maddelerin birikimine bağlı aşırı renklenme), piknosiz (çekirdekte kalınlaşma) gelişir. Kromatolisis (nissl maddesinin parçalanması) ortaya çıkar ve nükleus hücrenin periferinde olacak şekilde yer değiştirir. Astrositler, endotel şişer ve parçalanır. Nötrofil infiltrasyonu 4. saat gibi erken dönemde olur ve 36. saatte yoğunlaşır. 48. saat içinde mikroglia hücreleri artarak, yıkılmış myelin parçacıklarını toplar ve köpük makrofajları oluşturur. Daha sonra kapiller arterlerin çoğaldığı ve var olan damarlardan uzantıların olduğu “neovaskulasyon” dönemi başlar. Nekroz alanındaki elementler yavaş olarak reabsorbe olur ve fibrovasküler elementlerden ve glial hücrelerden oluşan bir kavite oluşur (1). Geniş infarktların üç farklı bölge oluştuğu söylenebilir:

- 1- Koagulatif nekrozun oluştuğu iç bölge
- 2- Nötrofil, lökosit infiltrasyonunun olduğu, şişmiş akson ve kalınlaşmış kapillerin oluşturduğu orta bölge
- 3- Hiperplastik astrositlerin oluşturduğu dış bölge

Serebral iskemiyi takiben meydana gelen doku hasarı, kompleks patofizyolojik mekanizmaların birleşmesi sonucu oluşur. Eksotoksisite, infarkt etrafında oluşan depolarizasyon, inflamasyon ve apoptozis bu patolojik mekanizmaların en önemlilerini oluşturur. Serebral iskemiden saniyeler ve dakikalar sonra kompleks biyokimyasal olaylar başlar ve saatler, günler boyunca devam eder.

Beyin dokusu, diğer dokulara nispeten oksijen ve glikoz yüksek oranda tüketilmektedir ve beyin dokusu enerji üretimi açısından neredeyse tama yakın oksidatif fosforilasyona bağımlıdır. Serebral kan akımındaki fokal bozulmalar beyin dokusu için gerekli olan maddelerin ulaşımına engel olur, aerobik glikoliz gerçekleşemez ve beyin enerji metabolizması bozulur. Gelişen enerji eksikliği sonucu nöronal hücre membran potansiyeli için gerekli olan iyon akışı sağlamaz ve nöron ve glial hücreler depolarize olurlar (15). Sonuç olarak presinaptik voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları aktive olur ve eksitator aminoasitler ekstraselüler alana salınır. Aynı zamanda, enerjiye bağlı diğer mekanizmalarda etkileneceğinden ve aminoasitlerin geriye alımı enerji bağımlı bir işlev

olduğundan glutamat geri alımı gerçekleşmez ve ekstraselüler alanda glutamat birikimi artar (16). Glutamat aşırı aktivasyonu, Ca^{++} yükünü artmasına katkıda bulunur, Na^+ ve Cl^- nöron içine girer, suyun pasif olarak nöron içine geçişi buna eşlik eder ve ödem oluşur (17, 18). Sonuçta oluşan ödem iskemik alanın perfüzyonunu direkt olarak etkileyebildiği gibi geniş iskemik alanlarda intrakranial basınç artışına da neden olarak serebral iskemiyi daha komplike hale getirebilir (16).

Hücre içi Ca^{++} artışı, sitoplasmik ve nükleer olaylara neden olarak doku hasarı gelişimde önemli bir rol oynar. Ca^{++} artışı hücre proteinlerinin yıkımı ile sonuçlanan proteolitik enzim ve serbest radikal üreten fosfolipaz A, siklooksijenaz aktivasyonuna neden olur (19, 20). Serbest radikaller kısa ömürlü ve düşük miktarlarda olmalarına rağmen, toksik etkileri nedeni ile doku hasarındaki katkıları büyüktür (21, 22). Artmış reaktif oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, membran hasarına, mitokondri DNA'sı ve proteinlerinde yıkıma ve ATP üretiminin durmasına neden olurlar (23,24,25, 26).

Bahsi geçen bütün eksitotoksik mekanizmalar fokal serebral iskemide temel başlangıç noktasını oluştururlar. Eksotoksik mekanizmalar akut nöronal ölüme neden olabildikleri gibi gecikmiş tipte hücre ölümü olan apoptozis başlangıcı olan moleküler olayları da başlatırlar. Ayrıca eksotoksik olaylar sırasında, post iskemik inflamasyonu başlatan gen ekspresyonunu stimule edilir. Bu nedenle eksotoksisite serebral iskemide patofizyolojisinde öncü kabul edilir ve inme tedavisinin hedeflerinde biridir (16). Serbest radikal tutucuları ve lipid peroksidasyon inhibitörlerinin iskemide koruyucu oldukları gösterilmiştir (27). Serbest radikaller süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimler ile zararsız hale getirilirler. SOD genini aşırı eksprese eden farelerin iskemide hücre ölümüne daha dirençli oldukları ve bu geni eksprese etmeyen farelerde ise infarkt hacminin arttığı gösterilmiştir (28, 29). Na^+ ve K^+ ve Ca^{++} iyon akışını sağlayan AMPA ve NMDA reseptör inhibitörleri iskemik model oluşturulan farelerde nöroprotektif ajan olarak kullanımı bazı çalışmalarda etkili bulunmuştur (30).

Artmış hücre içi Ca^{++} transkriptiyon faktörlerinin sentezini indükleyerek proinflamatuvar gen ekspresyonunu uyarırlar (31, 32, 33). Böylece hasar görmüş iskemik beyin dokusu tarafında, platelet-aktive den faktör, tümör nekrozezi edici faktör α (TNF- α), interlökin 1β (IL- 1β) gibi inflamatuvar mediatörler salınır. Mediatörler nötrofillerin vasküler duvardan iskemik beyin dokusu içine geçişini sağlarlar. Makrofaj

ve monositler nörofilleri takip eder ve serebral iskeminin 5-7. gününde iskemik alanda baskın hücre olurlar (34).

Serebral iskemi sonrası gelişen inflamasyonun iskemik hasara katkıda bulunduğu kanıtları giderek atmaktadır. Sistemik nötrojeni oluşturularak iskemik dokuya nötrofil infiltrasyonun azaltılması, beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca farelerde adhezyon moleküllerinin, bunların reseptörlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin nötralize edici antikörlerle bloke edilmesi ile iskemik hasar azaltılabilmektedir (35, 36, 37).

Post-iskemik inflamasyon çok çeşitli mekanizmalar ile beyin hasarına neden olabilir. Artan lökositlerin reperfüzyonda serebral kapilleri mekanik olarak tıkayarak dolaşımı bozduğu, hatta kan akımının tam dönmemesine neden olabileceği bilinmektedir (38). Aktive olan lökositlerin adhezyonu ve lökositlerin salgıladığı sitokinler aracılığı ile de hücre hasarına katkıda bulunabilir (39). Farelerde oluşturulan serebral iskemi sonrası infiltre eden nötrofiller serbest radikaller üretmektedir (40).

Serebral iskemiden sonra bir kısım nöron ise apoptozis ile daha yavaş olarak ölürlür (41, 42). Aşırı glutamat reseptör aktivasyonu, aşırı Ca^{++} yükü, serbest radikal aktivasyonu ve mitokondri ve DNA hasarı ile baskılanmış beyin dokusu nekroz yada apoptozis yolu ile ölmektedir (43, 44, 45).. Hangisinin gerçekleşeceği stimulusun doğası ve şiddetine, hücre tipine ve hücre yaşam siklusünün hangi noktasında etkilendiği bağlı olarak değişebilir (46, 47). Akut, kalıcı damar tıkanması sonucu genellikle nekroz oluşmaktadır. Fakat daha hafif hasarlarda ve özellikle iskemik alanın pneumbra'sında apoptozis benzeri nöronal ölüm görülebilmektedir (48).

Beyinde damar endoteli sıkı bağlantılar ile güçlendirilmiştir ve bu yapı basal lamina, astrosit, mikroglia ve perisitler ile birlikte kan beyin bariyerini (KBB) oluştururlar. KBB'in yapısını korumada basal lamina, endotel duvarına destek sağlayarak önemli bir rol oynar (49). KBB'i, santral sinir sistemini inflamatuvar hücre ve bakteri gibi egzogen invazif ajanlardan, kimyasal maddelerden korur. Serebral iskemide KBB yıkımı ile birlikte vasküler geçirgenlikte artar ve damar içindeki sıvı ve proteinlerin beyin dokusu içine geçişi gerçekleşir. Bu durum vazojenik ödem olarak adlandırılır. KBB'inin açılma nedeni kesin olarak bilinmemekle birlikte, tıkanmış vasküler yapı içinde trombojenik ve fibrinolitik faktörlerin endotel hücrelerinde kontraksiyona neden olduğu ve sıkı bağlantılı yapının bozulduğu ileri sürülmüştür. İskemi ile ortaya çıkan serbest radikallerin kan beyin bariyerini bozarak sıklıkla nöronal

ölüm ile sonuçlanan kanama ve ödeme neden olduğu, kan akımını bozduğu ve beyaz kürelerin iskemik dokuya geçmesini sağladığı gözlenmiştir (50).

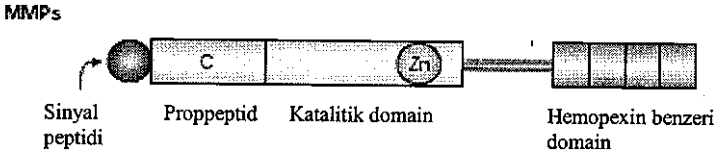
Proteazlar, bir çok nörolojik hastalıkta, nöroinflamatuvar cevabın bir parçası olarak ortaya çıkan moleküllerdir (51). Sistein, serin ve metalloproteinaz gen ailesini içeren proteazlar normal ve patolojik bir çok mekanizmada rol alırlar. İnme sonrası matrix metalloproteinaz (MMP) ekspresyonunda ve aktivitesindeki artış son yıllarda gösterilmiştir. İlişkili çalışmalar, basal membran komponenti olan laminin, fibronektin, tip IV kollojenin serebral iskemi ve reperfüzyondan sonra kaybolduğunu ve mikrovasküler bütünlüğün bozulmasında katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bir çok çalışma iskemik alanda vasojenik ödem ve hemorajik transformasyon gelişiminden MMP'ların sorumlu olduğunu ileri sürmektedir. Bu çalışmalar, MMP'ların ve basal membran degradasyonunun inmede KBB'nin bozulmasında ve lökosit infiltrasyonundaki rollerini göstermektedir (64, 66, 76, 78).

MATRİX METALLOPROTEİNAZLAR

Ekstraselüler matriksin zamanında yıkımı, embriyonik gelişme, morfogenez, üreme, ve doku hasarı ve yeniden şekillendirme gibi bir çok hayati işlemin gerçekleşmesi için büyük önem taşır. Matrixin olarak da adlandırılan MMP'lar, ekstraselüler matriksin yapısının oluşması ve yeniden şekillendirilmesin de merkezi bir rol oynayan oldukça geniş ve sayıca giderek büyüyen bir protolitik enzim ailesidir (52).

Günümüze kadar 23'ü insanda bulunan 24 adet farklı MMP enzimi tespit edilmiştir (Tablo-4, 53, 54). MMP'ların tamamı bir çok ortak yapısal özellikler taşıyan Zn^{+2} bağlı endopeptidazlardır ve bazı farklılıklar göstermekle birlikte temel olarak üç ana yapısal bölümleri vardır (Şekil – I):

- 1- Amino- terminal propeptid bölgesi;
- 2- Amino terminal katalitik domain;
- 3- Karboksi- terminal hemopexin benzeri domain;



Şekil – I: Matix metalloproteinazların genel yapısı

Tablo – 4 : Matriks metalloproteinaz ailesi

	Adı	Kolajen substratları	Diğer makriks substratları
MMP1	Collagenase 1	I, II, III, VII, VIII, X	Agg, Gel, PG
MMP2	Gelatinase A	I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV	Agg, EL, FN, Gel, LN VN
MMP3	Stromelysin 1	III, IV, IX, X, XI	Agg, EL, FN, Gel, LN VN
MMP7	Matrilysin	IV, X	Agg, Casein, EL, FN, LN, PG, VN
MMP8	Collagenase 2	I, II, III, V, VII, VIII, X	Agg, EL, FN, Gel, LN
MMP9	Gelatinase B	IV, V, VII, X, XIV	Agg, EL, FN, Gel, PG
MMP10	Stromelysin 2	III, IV, V, IX, X	Agg, EL, FN, Gel, LN
MMP11	Stromelysin 3		
MMP12	Metalloelastase	IV	Casein, EL, FN, Gel, PG, VN
MMP13	Collagenase 3	I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV	Agg, FN, Gel
MMP14	MT1-MMP	I, II, III	Agg, EL, FN, Gel, LN
MMP15	MT2-MMP		Agg, FN, Gel, LN
MMP16	MT3-MMP	III	Gel, FN
MMP17	MT4-MMP		Fibrinogen/fibrin
MMP18	Collagenase 4	I	
MMP19	RAS I 1	IV	Gel, FN, LN
MMP20	Enamelysin		Amelogenin
MMP21	Xenopus MMP		
MMP23			
MMP24	MT5-MMP		Gel
MMP25	MT6-MMP	IV	Gel, FN
MMP26	Matrilysin2/endometase		Gel
MMP27	Human MMP22		
MMP28	Epilysin		Casein

Amino propeptid bölgesi yaklaşık 80 aminoasitten oluşan, aminoasit sıralaması içinde içerdiği sistein ile enzimin inaktif - latent (zimojen, proMMP) formunu koruyan yapıdır. Amino-terminal katalitik domain ise, 70 aminoasitten oluşan, yapısında Zn^{+2} ve metionin içerir ve propeptid bölgesindeki sistein sıralaması ile bağlandığında enzim aktivitesinin bloke olduğu bölümdür. MMP-2 ve MMP-9 diğerlerinden farklı olarak bu bölgede, kolajen ve jelatin ile bağlantıyı sağlayan, üç kez tekrarlayan fibrinoktin tip-II domaine sahiptir. Karboksi- terminal hemopexin benzeri domain, MMP-7 ve MMP-26 dışındaki bir çok MMP'ın enzimin ekstraselüler substrat yada TIMMP'lar ile bağlantı sağladığı ve proteolitik aktivitenin gerçekleştirildiği bölgedir. MMP-23, karboksi terminalinde hemopexin domaini yerine sistein ve prolinden zengin IL-1 reseptörü benzeri bir domaine sahiptir. Membran tipi MMP'larda karboksi terminal bölgesinde onları hücre yüzeyine bağlayan trans membran domaini de bulunur (52, 53, 55).

Farklı MMP'ın kendine özgü substratı olmakla birlikte bir çoğu çok eşlidir ve birden fazla ekstraselüler matris substratına bağlanarak yıkımlarında rol alabilir (Tablo-1).

MMP'lar özel substratlarına, yapısal bölümlerinin sıralamasındaki benzerliğe, domain organizasyonlarına göre 6 başlık altında gruplandırılmışlardır (52):

1- Kolojenazlar: MMP-1,8,13,18

Bu enzimlerin ana özelliği interstisiyal kollojen I, II ve III'ün yıkılmasını sağlamalarıdır. Kolejenazlar ayrıca diğer bir çok ekstraselüler olan yada olmayan molekülü parçalayabilirler.

2- Gelatinazlar: MMP-2,9

Gelatinazlar denature olmuş kolejeni kolaylıkla sindirirler. Tip I, II, V, VII, X, kolojen, fibronectin, tenascin, fibrilin, osteonektin gelatinazların substratlarını oluştururç MMP-2 insanlarda osteogenezde önemli role sahiptir. MMP-9 inflamasyon durumunda bir çok dokuda etkili olurlar.

3- Stromelisinler: MMP-3,10,11

Ekstraselüler matris moleküllerini parçalamanın dışında MMP-3 bir kısım proMMP'nin aktivasyonunda ve MMP-1'in tam aktif hale gelmesinde de etkilidir.

4- Matrilisinler: MMP-7, 26

Tipik olarak karboksi domainleri yoktur. Endometaz olarak da adlandırılırlar. Bir çok ekstraselüler matriks molekülü dışında bir kısım hücre yüzey proteinlerinin prosesinde de rol oynarlar.

5- Membran tipi MMP'lar: MMP-14,15,16

a. Transmembran olanlar: MMP-14,15,16,24
proMMP aktivasyonunda görev alırlar.

b. Glikosilfosfatidilinositol ile bağlı olanlar: MMP-17,25

6- Diğerleri: MMP-12,19,20,21,23,27,28

Yukarıdaki sınıflandırma içinde yer almayan 7 MMP'ı içerir. MMP-12 asıl olarak makrofajlar içinde bulunurlar ve makrofaj migrasyonu için önemlidirler. Elastin yanı sıra bir çok proteini parçalayabilir. MMP-19 karaciğerde kromozomal DNA klonlamasında ve romotoid artritli hastalarında T-hücre kaynaklı otoantijenler olarak tespit edilmiştir. MMP-20 primer olarak yeni oluşmuş diş enemasında bulunmaktadır ve mutasyonunda yetersiz enema formasyonuna neden olan genetik bir hastalık, amelogenin imperfacta oluşur. MMP-23 üreme dokusunda bulunur. MMP-28 ana olarak keratinositlerde ekspresse edilir ve hemostaz, yara iyileşmesinde rol görev alır.

MMP'ların, güçlü proteolitik enzim olmaları ve yaygın destrüksiyon yapma yetenekleri olması, üretimlerinin ve aktivitelerinin oldukça kontrollü olmasını gerektirir.

İlk kontrol noktası transkripsiyon seviyesindedir. Bir çok MMP sürekli olarak bulunmaz ve hücre aktivasyonu sonrası gen indüksiyonu yolu ile üretilirler. Sitokinler (TNF- α , IL-1), büyüme faktörleri, integrinler, kimyasal ajanlar, fiziksel stres ve virüsler ise MMP'ları kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmede etkendirler. Bunun yanı sıra artmış MMP gen ekspresyonu; bazı supresör ajanlar (transforme edici büyüme faktörü β , retinoik asid, glukokortikoidler gibi) ile azaltılabilir (52,54).

İkinci kontrol noktası translasyon sonrası modifikasyonlardır. Bir çok MMP'lar hücre tarafından inaktif yapıda (zimojen) olarak sentez edilerek salgılanırlar. MMP'ların inaktif yapısında, propeptid bölgesindeki sistein katalitik bölgedeki Zn⁺² ile bağlantı halindedir. MMP'ların aktivasyonu ise sistein Zn⁺² bağlantısının koparılarak propeptid bölgesinin tamamen ayrılması ile sağlanır. In vivo olarak bir çok pro-MMP'lar doku ve plasma proteinazları yada fırsatçı bakteri proteinazları tarafından aktive edilmektedirler. Ayrıca proteolitik olmayan maddeler (4-aminofenilmerkurik

asetat) ve üre de zimojenleri aktive edebilir. Plasminojen-plasmin kaskadının MMP aktivasyonda çok önemli rollü olduğu ise gösterilmiştir. Pro-MMP-2'nin membran yüzeyinde MT1-MMP tarafından aktive edilmesi ise Bir MMP'nin diğer bir MMP tarafında aktive edilebildiğinin bir örneğidir (53).

MMP'ların aktivitelerinin üçüncü kontrol noktası, aktif MMP'ların katalitik bölgelerine bağlanan doku inhibitörleri (TIMP) ile etkileşim ile olur. Günümüzde dört adet TIMP bilinmektedir; TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4. Fizyolojik şartlarda TIMP'ler büyüme gelişme ve dokunun yeniden yapılandırılmasında eksprese edilirler ve direkt olarak MMP aktivitesini etkiler. TIMP-1'in üretimi fibroblast ve endotelial hücrelerde TGF- β tarafından düzenlenir ve spesifik olarak MMP-9'u inhibe eder (54, 56).

METALLOPROTEİNAZLARIN BİYOLOJİK VE PATOLOJİK ROLLERİ

Metalloproteinazlar; embriyo gelişimi, blastosit implantasyonu, ovülasyon, organ gelişimi, sinir dokusunun büyümesi, kemik yapısının şekillendirilmesi, yara iyileşmesi, angiogenez, apoptozis gibi bir çok fizyolojik olaya iştirak ederler. Bunun dışında artrit, kanser gelişimi ve metastaz oluşması, kardiovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, kan beyin bariyeri yıkımı, deri ülserasyonu, gastrik ülser, karaciğer fibrozis, amfizem, fibrotik akciğer hastalıkları gibi bir çok patolojik durumun gelişiminde de etkili olurlar. Her ne kadar MMP'ların asıl aktiviteleri doku resorpsiyonu ve hastalık progresyonu sırasında ekstraselüler matriksi ortadan kaldırmak olsa da; MMP'lar, ayrıca ekstraselüler makromoleküllerini proteoliz yolu ile parçalayarak biyolojik fonksiyonlarını değiştirirler (52, 54).

Aterosklerotik plakların zayıf bölgeleri sıklıkla MMP aktivitesi gösteren, yağ yüklü makrofajlar içerir. Benzer olarak medial tabakanın düz kasların MMP ürettiği ortaya konmuştur. MMP'ların aterosklerotik plakta özellikle hücresiz yağ tabakasının çeviren fibroz alanda yoğunlaşması, bu alanda matrix proteinlerinin MMP'lar tarafından yıkılması ve yapısal bütünlüğü zayıflatıldığı düşünülmektedir. Aterosklerotik plak rüptürünün, ekstraselüler matriksi zayıflatılmış bu bölgelerin artmış mekanik stresle olduğu düşünülmektedir (57, 58, 59).

METALLOPROTEİNAZLAR VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİ

Erişkin beyin dokusu çok özel bir ekstraselüler matrikse sahiptir. Temel olarak; bir lektin domaini ve bir hyaluronik asid bağlanma domaini içeren, bir çeşit proteoglikan olan lektikanlardan oluşur. Adhesiv/anti-adhesiv proteinler olan hyaluronik asid ve tenascin molekülleri de oldukça yoğun olarak beyin ekstraselüler matrikste bulunur. Vücudun diğer ekstraselüler matriksinden farklı olarak beyin ekstraselüler matriksin de kolojen, fibronektin, vitronektin, laminin gibi fibröz matriks proteinleri oldukça az miktardadır (60).

Metalloproteinazların bazı istisnalar dışında bir çoğu normal erişkin santral sinir sisteminde bulunmaz yada çok düşük seviyelerde bulunurlar (61, 62). Beyinde yapısal olarak düşük seviyelerde bulunan Matrilysin (MMP-7), proteoglikan, elastaz, tip IV kolojen ve myelin bazik protein gibi bir çok substratın yıkımını sağlamaktadır. Matrilysin normal SSS'de perisistler ile ilişkili olarak bulunur. Lektikan ailesi üyelerinden biri olan versikan ile matrilysin'in beraber gösterildiği aterosklerotik plaklarda yapılan biyokimyasal çalışmalar ile MMP'lar içinde matrilysin'in versikan yıkımında en etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Matrilysin'in normal beyin ekstraselüler matriksinde "idareci" enzim olarak görev aldığı sanılmaktadır (63).

Gelatinaz A (MMP-2) beyinde yapısal olarak bulunmaktadır ve denature olmuş kolojen, elastin, ve myelin bazik protein gelatinaz A'nın substratlarıdır. Tip IV kolojen, gelatinaz A'nın normal beyinde bulunduğu yer olan damarların etrafında bulunur. Kolojenin beyin parankiminde nispeten az bulunduğu ve kolojenin gelatinaz A için nispeten zayıf substrat olduğu düşünüldüğünde bu her ikisinin benzer bölgede görülmesi çok ilişkili durmamaktadır. Düşük seviyelerde Geletinaz A'nın varlığı, normal beyinde ekstraselüler membran bağımlı proteinlerin prosesini de gösteriyor olabilir (60).

Geletinaz B (MMP-9) ise normal beyin dokusunda gri ve beyaz cevherde gösterilememiştir (60, 61). Fakat bazen küçük damarlar içeren beyin parankiminde bulunmuştur (103, 64).

METALLOPROTEİNAZALAR VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİ HASTALIKLARI

Son yıllarda MMPs ve TIMMPs aktivitesinin santral sinir sistemi üzerinde faydalı ve zararlı çok merkezi rolleri olabileceğini ortaya çıkmıştır. Normal erişkin santral sinir sisteminde MMP'ler yok yada düşük seviyelerde eksprese edilirken ve upregulasyonları bir çok nörolojik hastalıkta bildirilmiştir. Genel olarak MMP'ların santral sinir sistemi hastalıklarındaki rolü 3 bölümde incelenebilir:

- 1- Nöroinflamasyon ve Multiple sklerozdaki (MS) rolleri
- 2- Malin nöroglionlar üzerine etkileri
- 3- Diğer nörolojik hastalıklar içindeki katkıları

Nöroinflamasyon ve Multiple skleroz :

MS demyelinizasyon ve aksonal kayıp ile karakterize immün bir hastalıktır. 20 yılı aşkın süreden beri MS hastalarının beyin omur ilik sıvılarında bazı proteinazların bulunduğu bilinmektedir ve bunların bir kısmının MMP'lar olduğu anlaşılmıştır. Özellikle MMP-9, normal kişilerin BOS'larında bulunmazken MS ve diğer nöroinflamatuvar hastalığı olanlarda yüksek olarak bulunmuştur. MS hastalarının serumunda MMP-9 seviyesi arttığı gibi lökositlerinde de MMP-9 mRNA artmış olarak tespit edilmiştir. Relaps dönemlerinde serum MMP-9 düzeyi remisyon dönemine göre daha yüksek olarak bulunmuştur. MMP'lar ile MS ve hastalık aktivitesi arasındaki korelasyon daha çok nedensel olup, deneysel otoimmün ensefalomyelit çalışmalarında MMP aktivite inhibitörleri ile hastalığı kısmen kontrol altına alınmış yada önlenmiştir. Ayrıca son yıllarda MS tedavisinde kullanmakta olan interferon- β ile serum MMP seviyesinde azalma ve MMP-9 eksprese eden lökosit sayısında düşme gösterilmiştir .

Malign nöroglionlar:

Bütün MMP üyeleri çeşitli kanser tipleri ile ilişkilidirler. Dolayısı ile beyin tümörlerinde MMP ekspresyonunda artış tespit edilmesi şaşırtıcı değildir. Özellikle MMP-2, MMP-9 ve MT-MMP'lar, yüksek gradli Glioblastom multiforme spesimenlerinde düşük gradli olanlara yada çalışmalarda kontrol grubu olarak alınan normal beyinlere göre yüksek oranda tespit edilmiştir. Glioma hücrelerinde MMP ekspresyonu, SSS kanserleri ile sistemik kanserler arasındaki farkı göstermektedir. Bir çok sistemik kanserde (meme kanserinde olduğu gibi) MMP'lar kanser hücresinden

ziyade sıklıkla stromada eksprese edilir. Glioma tedavisinde MMP inhibitörlerinin geliştirilmesi ümit davet edicidir ve bir kısmı klinik çalışmada denemiştir (65, 59).

Diğer nörolojik hastalıklar:

MMP'ların diğer bir çok nörolojik hastalığın patofizyolojisine katkılarının bulduklarının kanıtları vardır ve zaman içinde bu hastalıkların sayısının artacak gibi gözükmektedir. MMP'lar ile ilişkili nörolojik hastalıklardan bir kısmı aşağıdaki gibidir:

- İnme (66)
- Viral enfeksiyonlar (HIV enfeksiyonu ve HIV ile ilişkili demans)(67)
- Alzheimer hastalığı (68)
- İnflamatuar myopatiler (69)
- Amyotrofik lateral sklerozis (70)

MATRIX METALLOPROTEİNAZLAR VE NÖROİNFLAMASYON

Santral sinir sisteminin inflamasyonu vücudun diğer bölgelerindeki inflamasyondan farklı şekilde davranır (71). İnflamasyon sırasında, SSS'inde yerleşik olan mikroglial hücrelerin aktive olmasının yanı sıra kan dolaşımından bulunan mononükleer hücreler, nötrofillerin katılımı da gerçekleşir. Bu nedenle inflamasyona mikroglialardan kaynaklanan endojen etkinin kan kaynaklı etkiden ayrılması oldukça zordur. Kan lökositlerin kan beyin bariyerinden geçişleri lökositlerden salgılanan MMP'lar tarafından kolaylaştırılmaktadır (62, 72).

MMP'lar bir çok SSS hastalığına eşlik eden nöroinflamasyonun artması ve yürütülemede etkili olduğu gösterilmiştir. Sitokinler ve serbest radikalleri içeren nöroinflamasyon, deneysel olarak hayvan beyinlerine lipopolisakkarid yada TNF- α 'ın enjeksiyonu ile çalışılabilmektedir. Fare beyinine TNF- α enjeksiyonu ile 24 saat sonra MMP-9 üretimini indüklediği, aynı zamanda KBB'nin bozulduğu ve MMP inhibitörünün (Batimastat, BB-94) kullanılması ile KBB'in açılmasını bloke edildiği gösterilmiştir (73). Benzer olarak, lipopolisakkarid enjeksiyonundan 8 saat sonra KBB'nin açıldığı ve aynı zamanda MMP-9'un üretildiği diğer bir MMP inhibitörü (BB-1101) ile KBB'nin açılması bloke edilmiştir (74). Lipopolisakkarid enjekte edilmiş

beyinlerin immünohistokimyasal çalışmalarında enjeksiyon bölgelerinde MMP-3 ve MMP-9 üretimi gösterilmiştir (75).

İSKEMİK SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR VE METALLOPROTEİNAZLAR

MMP'ların inmedeki rolü farelerde fokal serebral iskemiden sonra MMP-2 ve MMP-9'un hızlı olarak arttığı gösterilmesi ile gündeme gelmiştir (76, 77). İnsanlarda, post mortem olarak infarkt geliştiği günlerde beyinde MMP-9 artışı saptanmıştır ve ilginç olarak bu yükseklik olaydan aylar sonra ölen hastalarda yüksek kalmıştır (78). MMP-9, infarktten bir hafta sonrasında kadar geçen süre içinde hastalardan alınan dokulardaki nötrofillerde güçlü olarak eksprese edilirken MMP-2 ve MMP-7 ekspresyonu oldukça az belirgin bulunmuştur. Bir haftadan 5 yıl süre içinde lezyonda nötrofiller yoktur MMP-2 ve MMP-7 için immunreaktif olan makrofajlar oldukça fazladır (79). Artmış MMP ekspresyonu inmede doku harabiyetine katkıda bulunuyor olabilir. MMP'ler nöronları öldürme kapasitesine sahiptirler (Literatür ekle).

Biyokimyasal çalışmalar sonucu iskemide, MMP'ların KBB bozulmasında katkıda bulunduğu ve vasojenik ödeme, hemorajiye yol açtığı gösterilmiştir (73). Kendiliğinden hipertansif farelerde kalıcı MCA oklüzyonu saatte belirgin MMP-9, 5. günde MMP-2 artışı ile sonuçlanmıştır. MMP-9 artışı, maksimum hasar ile korele iken, MMP-2'nin yükselmesi lezyon etrafındaki astrosit reaktivasyonu ile koreledir. Kendiliğinden hipertansif farelerde 90 dakika süre ile orta serebral arter oklüzyonu ve tekrar reperfüzyonu KBB'de bifazik açılma ile sonuçlandı. İlk açılma 3.saat ve 2. açılma daha şiddetli olarak 48.saatteydi ve 3.saatteki açılma MMP-2 artışı korele iken 48.saat MMP-9 artışında korelasyon bulundu (80). MMP-9'dan yoksun farelerde yapılan deneylerde daha az kan beyin bariyeri hasarı ve daha küçük infarkt volümü tespit edildi (81, 82). Ayrıca süperoksit dismutası yüksek miktarlarda bulunan farelerde proMMP-9 üretiminin daha az olduğu gösterildi (83).

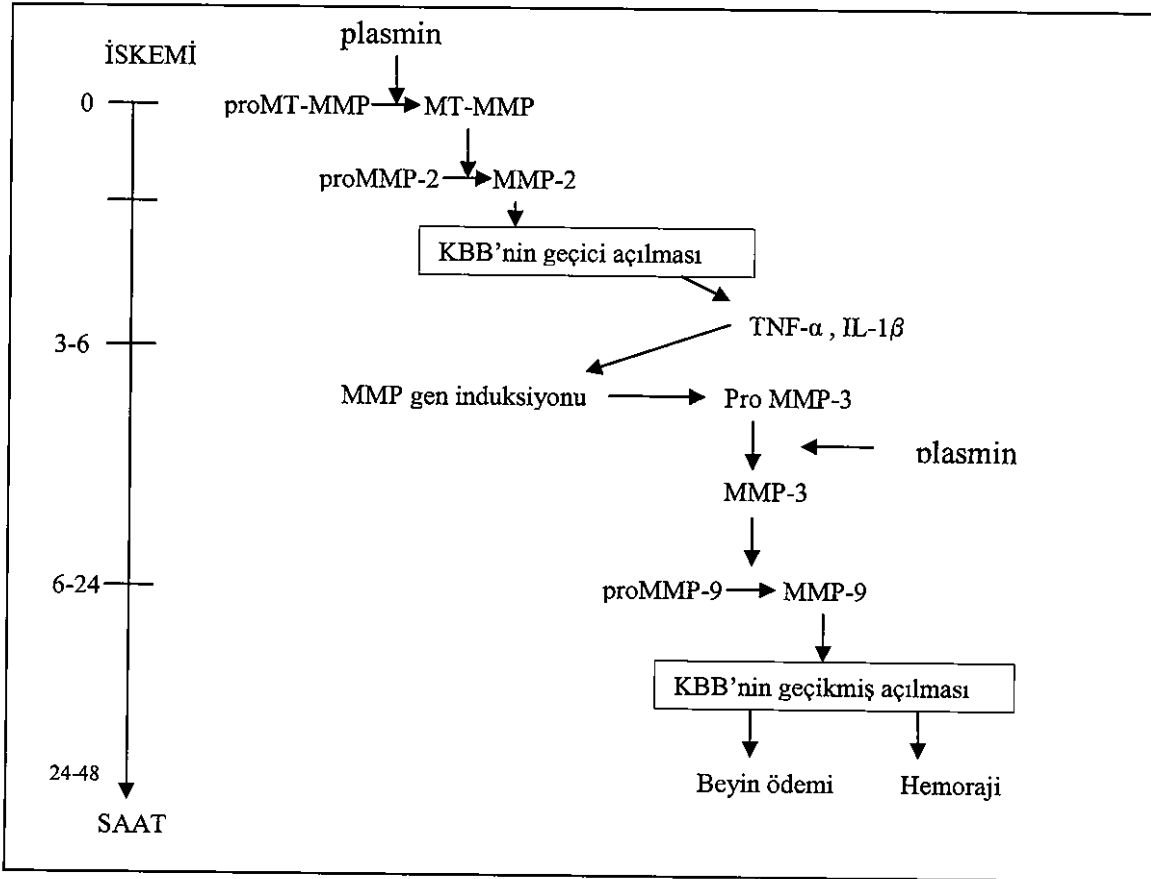
Kan beyin bariyerinin bozulması ile sonuçlanan yolu etkileyen bir çok faktör vardır. Bir çok çalışmada plasminojen/plasmin sisteminin ve MMP'ların etkisini vurgulamaktadır. Bazı yönler henüz anlaşılmamış olmakla birlikte MMP'ların nörovasküler ünite üzerine etkileri öncelikle düşünülmektedir. Nörovasküler ünite astrositlerin uzantıları, sıkı bağlantılar kuran endotel hücreleri, perisit/mikroglia ve basal

laminayı içermektedir. Endotelial hücrelerin oluşturduğu sıkı bağlantılar enzimlerin beyne girmeden önce karşılaştıkları ilk savunmayı oluşturur. Endotelial hücrelerin etrafını saran bazal lamina elektriksel yük taşıyan bir barier oluşturur ve büyük moleküllü hücrelerin geçişini engeller. MMP'lar bazal laminanın komponentleri olan heparan sulfat, laminin, fibronektin, tip IV kolojen parçalarlar. İskemi ve hipoksiye bağlı hücrel stres boyunca proteazların aktivitesi sonucu basal laminanın makromolekülleri kaybolur ve matriks kaybı hemoraji oranını artırır (84). Perisitler makrofaj benzeri hücreler olup endotelial hücrelere komşu ve basal lamina ile çevrilidirler. Ekstraselüler matriksin proteolizisi beyin doku hasarına kan damarı çeperinin bozulması ve geçirgenliğin artması ile direkt yada indirek olarak hücreler arası bağlantıyı gevşeterek, sinyal moleküllerinin kanallar ile bağlantısını kopararak, besin geçişini bozarak hücre ölümüne neden olarak yapabilir. Ekstraselüler matriksteki değişikliklerin hücre ölümüne neden olmasının diğer bir yolu ekstraselüler matriksin fibrotik doku ile dolup, hücrenin yaşamsal faaliyetlerini koruması için gerekli olan tropik faktörlerin ve besin geçişinin engellenmesi ileidir.

ProMMP'ler aktivasyonun proteolitik prosesin gerçekleşmesinde mekanizmaları iyi anlaşılmamış fakat oldukça kritik bir basamaktır. Hücre kültürlerinde mikrogliyal proMMP'leri aktive etmek üzere perisit, endotel hücreleri ve astrositler ile ilişki içine girer. ProMMP'lerin aktivasyonu için mikrogliyal gereklidir. İskemik olaylarda TNF-alfa, IL-1 β gibi inflamatuvar mediatörlerin salınımı MMP'ların üretimini artırır. Plasminojen/plasmin sistemi TIMP-2'nin varlığında proMT1-MMP'nin aktivasyonunu sağlayarak bu üretime katkıda bulunur. MT1-MMP2nin plasmin tarafından aktive edilebilmesi plasminojen/plasmin sisteminin MMP'lar ile ilişkiye girdiği basamaktır. İnflamatuvar proses şiddetlendikçe MMP-3 ve MMP 9 genleri indüklenir ve MMP'ların latant formları oluşur.

İskemik serebrovasküler geçiren bir hastada, MMP'ların seviyesi kanda artar. MMP-2 ve MMP-9'un serum seviyeleri kardiyembolik SVH'lı hastalarda ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. National Institutes of Health (NIH) inme skoru hastaları hafif inme ve ağır inme olarak iki gruba ayırmada kullanılmaktadır. NIH inme skoru yüksek olan yani ağır inneli hastaların basal MMP-9 değerleri anlamlı oranda yüksektir ve 48 saat boyunca yüksek kalmaktadır (85). Parankimal kanama yada hemorajik transformasyon durumunda En yüksek MMP-9 yüksekliği geç dönemde hemorajik transformasyona uğrayan hastalarda en yüksektir (86).

İnsan ve hayvan çalışmalarından proteazlar tarafından yönlendirilen hücre hasarının İnmedeki rolü ortaya konmuştur. Normal olarak MMP-2 beyinde damarlarının etrafında, astrositlerin uzantılarının sonunda, ependimal ve pial yüzeylerde bulunurlar. Astrositler tarafından üretilen latant MMP-2, iskemik olayın gerçekleşmesi ile aktif hale gelir. Bu plasminojenin plasminojen aktivator tarafından plasmin'e dönüşümünü içerir. Plasmin, latant MMP-2'nin başlıca aktivatörü olan MT-MMP'i aktive eder. MMP-2 aktivasyonuna sekonder gelişen erken dönemde ki KBB açılması MMP-inhibitorlerinin kullanılması ile bloke edilebilir. Fakat tedavinin kesilmesi ile birkaç saatte tekrar eski durumuna geri dönüş olur. Kan beyin baryierinde yirmi dört- kırk sekiz saat sonra ikinci ve daha ağır bozulma meydana gelir. Bifazik KBB bozulması paterninin bu ikinci dönemi irkaç gün devam edebilir ve bu dönem vasojenik ve hemorajik transformasyon ile sonuçlanabilir (87). Vasojenik ödem ise zaten var olan sitotoksik ödeme katkıda bulunur. İkinci damar hasarının gerçekleştiği bu dönemde MMP-9 belirgin olarak artar. MMP-9 indüksiyonu sitokinler ve erken gen ekspresyonu tarafından yönetilir. Latant MMP-9'un aktif hale gelmesi diğer MMP'lar ve serbest radikaller ile olmaktadır. Hücre kültürlerinde, mikrogliyal hücreler tarafında üretilen MMP-3 ve serbest radikallerin, daha az olasılıkla plasminin ile MMP-9 aktivasyonu sağlanmıştır (51).



Şekil – II: İskemi ve matriks metalloproteinazlar

MATERYAL METODLAR

Ocak 2003 ve Ağustos 2004 tarihleri arasında, Üniversitemiz Nöroloji kliniğine, fokal nörolojik defisit ile başvuran ve akut iskemik inme tanısı konan hastalar çalışmaya alınarak prospektif olarak araştırıldı. Çalışma süresi içinde toplam olarak 104 iskemik inmeli hasta değerlendirildi.

Çalışmaya alınan 104 iskemik inmeli hastanın demografik özellikleri, öz geçmişlerinde var olan vasküler risk faktörleri (diabetes mellitus, hipertansiyon, sigara kullanımı, kan yağları yüksekliği, geçirilmiş inme öyküleri), geliş sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri, kan biyokimyasal değerleri (tam kan sayımı, sedimentasyon, C-reaktif protein, kan şekeri düzeyi, böbrek fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri, total protein, serum albumin, , kan lipid profilleri “trigliserid, kolesterol, HDL, LDL”) detaylı olarak kaydedildi.

Tüm hastaların iskemik inmenin nedensel mekanizmasına yönelik daha önce belirlenmiş teşhis protokolünce elektrokardiyografi, ECHO kardiyografi ve karotid, vertebral arter doppler ultrasonografi tetkikleri yapıldı. Çalışmada akut yada kronik enfeksiyon varlığı, kronik karaciğer yada böbrek hastalığı, kronik konnektif doku hastalıkları, malinite, iskemik inme dışındaki diğer fokal nörolojik defisit yapan durumların varlığı dışlama kriterleri olarak belirlendi. 7 hasta eşlik eden kronik infalamatuar hastalık (romatoid artrit), malinite yada akut yada kronik böbrek, karaciğer yetmezliği nedeni ile çalışmaya alınmadı. 10 hasta çalışma sırasında akut enfeksiyon geçirmeleri (pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu) ve 28 hasta poliklinik takiplerine gelmemeleri nedeni ile çalışmaya dışında bırakılmıştır.

İskemik serebrovasküler olayın birinci günü akut dönem, birinci haftası subakut dönem ve birinci ayı ise kronik dönem olarak tanımlandı. Hastaların nörolojik muayeneleri kliniğe kabul edildikleri ilk günde ve takiplerinin birinci haftası ve birinci ayında yapıldı. Nörolojik muayene ile eş zamanlı olarak serum MMP-9 seviyelerini belirlenmek üzere kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve daha sonra topluca çalışılmak üzere -70 °C’de saklandı. Çalışma sonunda yaşayan hastaların birinci aydaki MMP-9 değerleri, bir aydan önce ölen hastaların ise kaydedilen en son MMP-9 değerleri son MMP-9 seviyesi olarak kabul edildi.

İnme şiddeti ve nörolojik defisit durumunu belirlemek üzere National Institutes of Health Stroke Scale – NIHSS (Tablo-5) kullanıldı. İnmenin birinci gün, birinci hafta ve birinci ayda hastaların NIHSS skorları belirlendi. Bir aylık takip sonunda yaşayan hastaların birinci ay NIHSS skorları, ölen hastaların ise son kaydedilen NIHSS skorları son NIHSS skoru olarak alındı.

Hastalar nörolojik durumda değişiklikler birinci gün ve çalışma son NIHSS skorları karşılaştırılarak 3 gruba ayrıldı:

- 1- İyileşme gösteren grup; NIHSS skorunda 4 ve 4 puandan fazla azalma olması.
- 2- Kötüleşme gösteren grup, NIHSS skorunda 4 ve 4 puandan fazla artma yada ölüm olması hali.
- 3- Stabil olan grup; NIHSS skorunda 4'den az değişiklik olan hastalar.

Analiz aşamasında stabil olan ve kötüleşme gösteren grup beraber olarak değerlendirildi.

SVH şiddeti değerlendirilmesi açısından hastalar NIHSS değerlerine göre 3 gruba ayrıldı:

- 1- NIHSS puanı <8 olan hastalar
- 2- NIHSS puanı 8-20 olan hastalar
- 3- NIHSS puanı >20 olan hastalar

Bu gruplanmaya göre;

- 1- NIHSS puanı <8 olan hastalar hafif nörolojik defisitli hastalar
- 2- NIHSS puanı \geq 8 olan hastalar ağır nörolojik defisitli hastalar

olarak belirlendi.

İnme prognozu ise hastaların birinci ay muayenelerinde Modified Rankin Scale – MRS (Tablo-6) kullanılarak belirlendi. MRS' larına göre hastalar:

- 1- MRS \leq 2 olan hastalar iyi prognozlu
- 2- MRS >2 olan hastalar kötü prognozlu

olmak üzere iki grup altında incelendi.

Bu süre içinde ölen hastaların prognoz durumu MRS'a göre 6 olarak değerlendirilmiştir.

Tüm hastaların iskemik olaylarının ilk 24 saati içinde intraserebral hemoraji ekartasyonu ve iskemik inmenin erken bulguları açısından BBT görüntülemeleri yapılmıştır. Erken BBT bulguları olarak sulkuslarda silinme, ventrikül kompresyonu ve hipodens alanların saptanması dikkate alınmıştır.

İnfarkt volümünü hesaplamak amacı ile tüm hastaların kranial görüntülemeleri BBT ve/veya kranial MRI ile inmenin 3. günü ile birinci hafta arasında tekrarlanmıştır. İnfarkt volümü, kranial görüntüleme A ve B en geniş çaplar ve C infarkt alanın kalınlığını göstermek üzere $0.5 \times A \times B \times C$ hesaplama yöntemi ile yapılmıştır. BBT ve kranial MRI'da saptanan infarktlar lokalizasyonlarına göre:

- 1- Karotis sistem
- 2- Vertebrabasiler sistem

olarak gruplandırıldı.

Çalışma sırasında bütün hastalar profilaktik dozda antikoagulan tedavi (subkütan düşük molekülür ağırlıklı heparin) ve 100 / 300mg dozunda antiagregan tedavi aldı. Çalışma boyunca hiç bir hasta antitrombolitik tedavi almadı.

Kontrol grubu; nöroloji, ortopedi, psikiyatri polikliniklerine başvuran fizik ve nörolojik muayene bulguları normal olan; hipertansiyon, diabetes mellitus, kronik inflamatuvar ve karaciğer, böbrek rahatsızlığı, geçirilmiş SVH öyküsü ve klinik bulguları olmayan sağlıklı bireylerden seçildi.

Bu çalışma Hastane Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek onamları alınmıştır.

Tablo – 5: NIHSS - (National institutes of health stroke scale)

<p>1-a: Bilinç,</p>	<p>0: uyanık 1: uyanık değil fakat minör uyaran ile uyandırılıyor, emirler uyuyor, cevap veriyor 2: uyanık değil, tekrarlayan uyaranlarla uyanıyor veya ağırlı uyaran ile hareket ediyor 3: ağırlı uyarana cevapsız, sadece refleks motor cevabı var, arefleksi</p>	<p>-----</p>
<p>1-b: Soruları cevaplandırma, Ay ve yaş sorulur, cevap doğru olmalıdır. Afazik veya soruları anlayamayan stuporlu hastalar için 2 puan verilir. Konuşma engelleri olan, ağır dizartrisi olan hastalar için 1 puan verilir.</p>	<p>0: her ikisine doğru cevap 1: yalnız birine doğru cevap 2: her iki soruya doğru cevap verememe, yada yanlış cevap verme</p>	<p>-----</p>
<p>1-c: Emirleri uygulama, Gözlerini açıp kapaması ve felçli olmayan elini sıkması istenir. Emri uygulama girişimi oluyor fakat tamamlanamıyorsa puan verilir.</p>	<p>0: her iki emri doğru olarak yapıyor 1: yalnızca bir emri doğru olarak yapıyor 2: her iki emri uygulayamıyor</p>	<p>-----</p>
<p>2: Işık refleksi,</p>	<p>0: her iki gözde cevap var 1: yalnız bir gözde cevap var 2: her iki gözde yanıt yok</p>	<p>-----</p>
<p>3: Göz hareketleri, Sadece yatay göz hareketleri test edilir Volunter yada refleks (okulosefalik) göz hareketleri test edilebilir. Şayet volunter yada refleks hareket ile düzelen konuge deviasyon varsa 1 puan verilir. Şayet izole periferik sinir paralizi varsa 1 puan verilir.</p>	<p>0: normal 1: parsiyal bakış paralizi: Şayet bir yada iki gözde göz hareket bozukluğu varsa 2: volunter yada refleks hareketle düzelmeyen deviasyon ve total bakış paralizileri</p>	<p>-----</p>
<p>4: Görme alanı, Üst ve alt kadranda değerlendirilir. Şayet tek taraflı körlük varsa, değerlendirme sağlam gözde yapılır. 1 puan sadece kesin sınırlı asimetri (quadrantanopi) varsa verilir.</p>	<p>0: görme kaybı yok 1: parsiyal hemianopi 2: tam hemianopi 3: bilateral hemianopi (kör, kortikal körlük dahil)</p>	<p>-----</p>

<p>5: Fasial paralizi, Emirleri anlamayan hastada ağrılı uyarana beliren cevabın simetrikliği değerlendirilir.</p>	<p>0: normal simetrik hareket 1: minor paralizi (nazolabial sulkusta silinme,gülümseme asimetri) 2: parsiyal paralizi (total yada totale yakın paralizi) 3: tek yada her iki taraflı tam paralizi</p>	<p>-----</p>
<p>6: Motor; kol Oturur pozisyonda kolların 90° yatar pozisyonda 45° ve bacaklar yatar pozisyonda 30° kaldırılması istenir. Afazik hastalara hareket gösterilerek yaptırılmalı ağrılı uyarın vermemeli.</p>	<p>0: düşme yok, 90°(yada 45°) de 10 saniye tutabiliyor 1: 90°(yada 45°)ye kaldırabiliyor fakat 10saniyeden önce düşüyor, yatağa vurmuyor 2: yerçekimini bir miktar yenebiliyor fakat 90°(yada 45°)de tutamıyor 3: yerçekimine karşı direnemiyor, hemen düşüyor 4: hareket yok</p>	<p>Sol ----- Sağ -----</p>
<p>7: Motor; bacak Sadece yatar pozisyonda değerlendirilir</p>	<p>0: düşme yok, 30°de 5 saniye tutabiliyor 1: 30°ye kaldırabiliyor fakat 5 saniyeden önce düşüyor fakat yatağa vurmuyor 2: yerçekimini bir miktar yenebiliyor fakat 30°de tutamıyor 3: yerçekimine karşı direnemiyor, hemen düşüyor 4: hareket yok</p>	<p>Sol ----- Sağ -----</p>
<p>8: Limb ataksi Gözler açıkken test edilir. Görme bozukluğu olduğunda görme alanının sağlam olduğundan emin olunmalı. Her iki taraflı olarak parmak burun ve diz topuk testi yapılmalı. Anlamayan yada paralizi durumunda ataksi yok kabul edilmeli.</p>	<p>0: yok 1: bir ekstremitede var 2: iki ekstremitede var</p>	<p>-----</p>
<p>9: Duyu, Toplu iğne ile batırılarak yada bilinci kapalı-afazik hastalarda ağrılı uyarın verilerek test edilir. Bir çok ekstremitede ve yüzde yapılmalı. Sadece stroğa bağlı duyu kaybı değerlendirilmeli. Sadece kesin tam duyu kaybı olduğunda 2 puan verilmeli. Bu nedenle muhtemelen stuporda yada afazik olan hastalarda 1 yada 0 puan verilebilir. Bilateral duyu kayı olan beyin sapı lezyonu durumunda 2 puan verilir.Hastanın cevabı yoksa yada quadriplejik ise 2 puan verilir. Koma hastalarına (1a:3 olan) 2 puan verilir.</p>	<p>0: Normal, duyu kaybı yok 1: Hafif orta duyu kaybı, yüzeysel duyuda kayıp var fakat hasta dokunulduğunu anlıyor 2: ağır yada tam duyu kaybı, hasta dokunulduğunu farkında değil</p>	<p>-----</p>

<p>10: Konuşma Bir resimdeki nesnelere isimlendirmesi, olayı anlatması ve okuması istenir. Şayet görme kaybı durumunda eline verilen objeleri tanıması ve konuşulanı tekrarlaması istenir. Koma hastalarında (1a:3) 3 puan verilir. kısmen iletişim kurulabilen yada stupor durumunda 3 puan sadece tamamen sessiz ve emirlere uymama durumunda verilmeli.</p>	<p>0: normal 1: hafif - orta afazi, fikirlerin ifadesinde ve konuşmanın formunda önemli bozulma olmadan, akıcı konuşmada yada anlamada azalma 2: ağır afazi, tüm iletişim parça parçadır, dinleyen için sonuç çıkarmak ve tahmin oldukça zordur. 3: sessiz, total afazi</p>	<p>-----</p>
<p>11: Dizartri, hastadan okuması yada konuşulanı tekrarlaması istenir. Afazik hastalarda konuşmanın anlaşılır olup olmadığına bakılır.</p>	<p>0: normal 1: hafif – orta dizartri, güçlükde olsa anlaşılıyor 2: ağır dizartri, Konuşma anlaşılacak kadar bozuk yada sessiz</p>	<p>-----</p>
<p>12: Neglect, yeterli bilgi daha önceki testler sırasında edinilmiş olabilir. Görme kaybı olan hastalarda, çift taraflı yüzeysel uyarılara verilen cevap normale neglectde normaldir. Şayet hasta afazik fakat her iki tarafı ile ilgileniyorsa skor normaldir. Görsel neglect yada anosagnosi durumu da anormal olarak derecelendirilir. Sadece anormallik olduğunda skora yapılabildiğinden, neglect asla test edilemez değildir.</p>	<p>0: normal 1: bilateral aynı zamanlı uyaran ile görsel, dokunma, işitsel, kişisel dikkatsizlik yada ihmalin herhangi birisinin olması 2: birden çok durumda belirgin yarım dikkatsizlik (hemi-inattention), sadece bir boşlukta elini yada yönünü-durumunu algılayamama</p>	<p>-----</p>
<p>13- Plantar yanıt,</p>	<p>0: normal 1: tek taraflı babinski 2: iki taraflı babinski</p>	<p>-----</p>

Toplam Puan: -----

Tablo – 6: Modified Rankin Skalası

SKOR	TANIM
0	Semptom yok
1	Semptom olmasına rağmen önemli sakatlık yok; Günlük aktivitelerini yerine getirebiliyor
2	Hafif sakatlı; Daha önce gerçekleştirmekte olduğu bütün aktivitelerini gerçekleştiremiyor, fakat kendine bakabiliyor
3	Orta derecede sakatlık; Kısmen yardıma ihtiyacı var, fakat yardımsız yürüyebiliyor
4	Orta derecede ağır sakatlık; Yardımsız yürüyemiyor ve günlük ihtiyaçlarını göremiyor
5	Ağır sakatlık; Yatağa bağımlı, inkotinası var, sürekli bakım ve diakkate muhtaç
6	Ölüm

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Hasta ve kontrol gruplarından aynı şartlarda kan örnekleri alındı ve aynı test kitleri kullanılarak çalışıldı. Hasta ve kontrollerden antekübital vene disposable 10.cc'lik enjektör ile girilerek kan örneği alındı. Alınan kanlar MMP-9 ve biyokimyasal tetkikler çalışılmak üzere gerekli tüplere aktarıldı.

MMP-9 analizi:

MMP-9 çalışılmak üzere hasta ve kontrollerden alınan kan örnekleri, separatör jel ve klot aktivatör içeren vakutainer tüplere konarak düz kan örnekleri alındı. Pıhtılaşma beklendikten sonra 1200g'de 10 dakika süre ile santrifuj edilerek serum örneği ayrıldı. Hasta ve kontrollerden elde edilen serum örnekleri daha sonra toplu olarak çalışılmak üzere -70 derecede saklandı.

Hasta ve kontrol grubu serumlarında MMP-9 tayinleri Biotract, Amersham Pharmacia firmasının ticari Enzim immünassay (ELİSA) kitleri kullanılarak kit prospektüsündeki tayin talimatlarına uygun olarak yapıldı. (Cat NO: Biotract, Amersham Pharmacia, Biotech- UK)

Rutin biyokimyasal analizler:

Hasta grubundan serebrovasküler olayın ilk gününde alınan düz kan örnekleri separatör jel ve klot aktivatör içeren vakutainer tüplere konaduktan sonra pıhtılaşma beklendi. Pıhtılaşma sonrası 1200g'de 10 dakika süre ile santrifuj edilerek serum örneği ayrıldı. Hasta serumlarından glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol, BUN, kreatinin, ALT (alanin transaminaz), AST (aspartat transaminaz), C-reaktif protein tayinleri Roche Diagnostics, Modular D-P analitik sistemlerinde kendi orijinal kitleri kullanılarak yapıldı. Glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol sonuçları analizlerde kullanılırken, diğer tetkikler hastaların çalışmaya alınmak için uygun olup olmadıklarının tayini için kullanıldı.

Kan sayımı ve sedimantasyon analizleri:

Hastaların 2ml, %7.5 K3-EDTA içeren tüplere alınmış olan tam kan örneklerinde kan sayım analizleri Coulter kan sayım teknolojisiyle çalışan Coulter Gen-S otomatik kan sayım cihazında kendi orijinal reaktifleri kullanılarak yapıldı.

Eritrosit sedimantasyon hızı tayini 1,6ml, %38 Na-sitarat içeren tüplere alınan kan örneklerinde belirli zaman periyodlarında optik dansite okuması yaparak, bunu 1 saatlik değere uyarlayan otomatik sedimantasyon tayin cihazında (Greiner) yapıldı.

İSTATİKSEL ANALİZLER

Verilerin istatistiksel analizinde Halk Sağlığı Anabilim Dalı'nda lisanslı olarak bulunan SPSS 13.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

Ölçümle elde edilen veriler (MMP-9, Geliş sistolik ve diastolik kan basıncı, glukoz, trigliserid, kolesterol, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol, Hb, htc, lökosit, trombosit, sedimasntasyon) ortalama \pm standard sapma olarak, nitliksel veriler (Diabetes Mellitus, hipertansiyon, kroner arter hastalığı, atriyal fibrilasyon varlığı, SVH öyküsü, sigara alışkanlığı) % olarak ifade edildi.

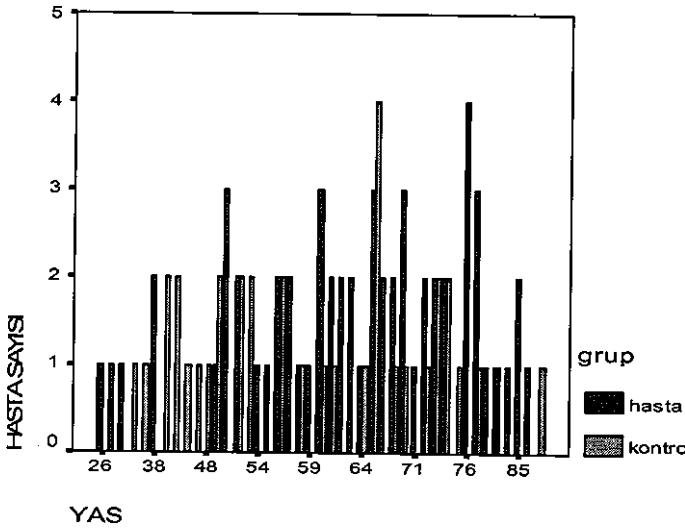
Ölçümlerde elde edilen verilen parametrik koşulları sağladığı için kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda ve hasta grubu içinde farklı özellikleri olan iki grubun karşılaştırılmasında Student's t testi, 3 grup olarak karşılaştırmalarda ANOVA (post hoc Tukey) testi kullanıldı.

Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanıldı.

Verilerin birbirine göre değişimleri Pearson ve sperman korelasyon analizleri ile değerlendirildi.

BULGULAR

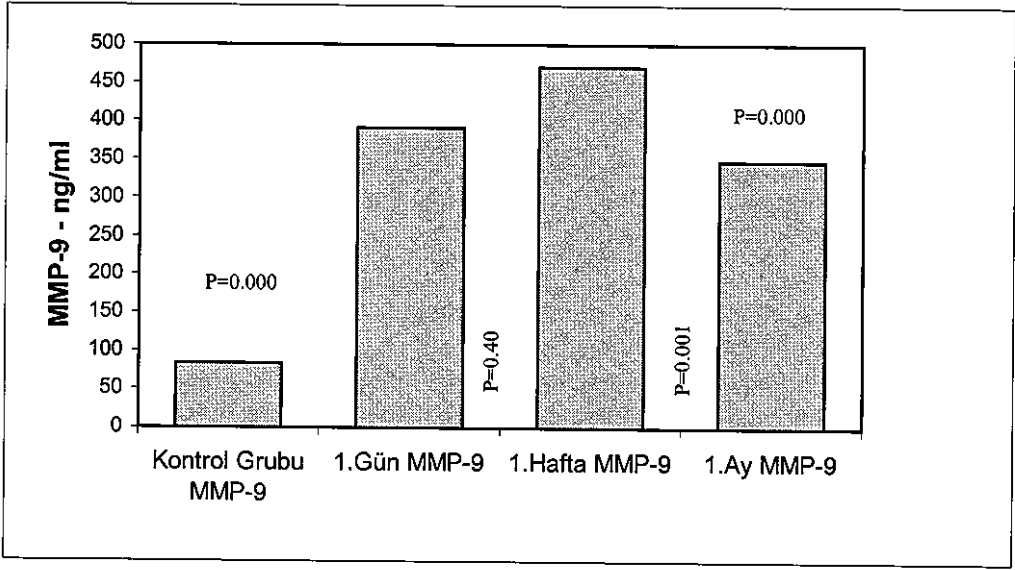
Çalışmaya 35'i kadın, 24'ü erkek olmak üzere 59 iskemik inme hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 63.53 ± 13.7 , yaş aralığı ise 26 ile 86 arasındaydı. Kontrol grubu olarak 19'u kadın, 16'ı erkek toplam 35 kişi alındı. Kontrol grubunun yaş ortalaması 58.4 ± 14 , yaş aralığı ise 32 ile 94 arasındaydı. Kontrol grubu ile hasta grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu (yaş için $p=0.086$ ve cinsiyet için $p=0.633$)



Grafik-1: Hasta ve kontrol grubunun yaş dağılımı

Hasta grubunun ortalama MMP-9 değerleri birinci günde 397.1 ± 154.2 ng/ml, 1. haftada 459.5 ± 97.8 , 1 ng/ml ve 1. ayda 356.4 ± 150.5 ng/ml olarak bulundu. Hasta grubunun her üç MMP-9 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0.000$).

Birinci hafta ortalama MMP-9 değerinde 1. günde göre artmış olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p=0.402$), 1. ay MMP-9 değerinde, birinci gün ve birinci hafta MMP-9 değerlerine göre azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (sırası ile $p=0.000$ ve $p=0.001$). Kontrol grubunda ortalama MMP-9 değeri ise 83.9 ± 19.3 ng/ml bulundu. Hasta grubundaki bütün MMP-9 değerleri sağlıklı kontrollerin ortalama MMP-9 değerlerinden oldukça yüksek ve fark istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ($p=0.000$).

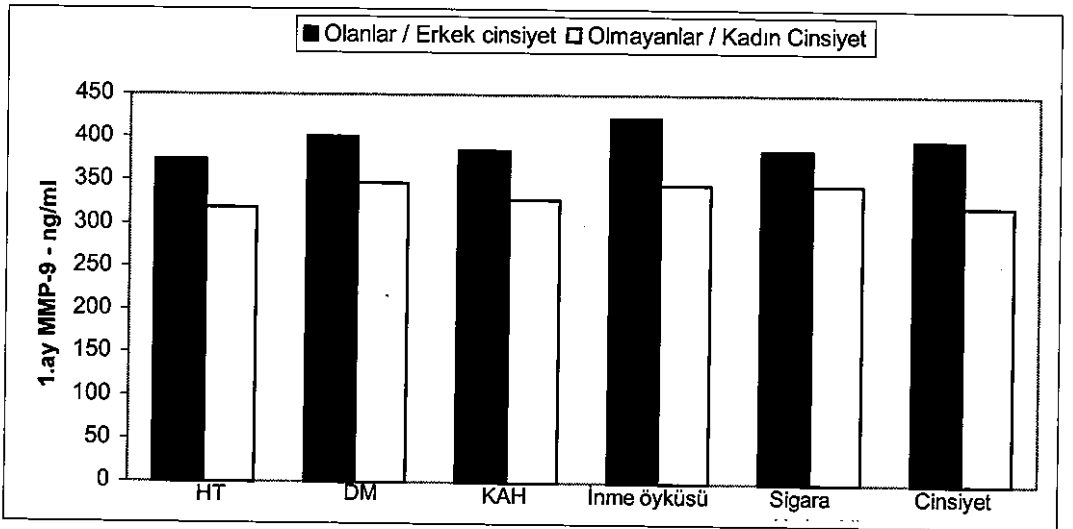
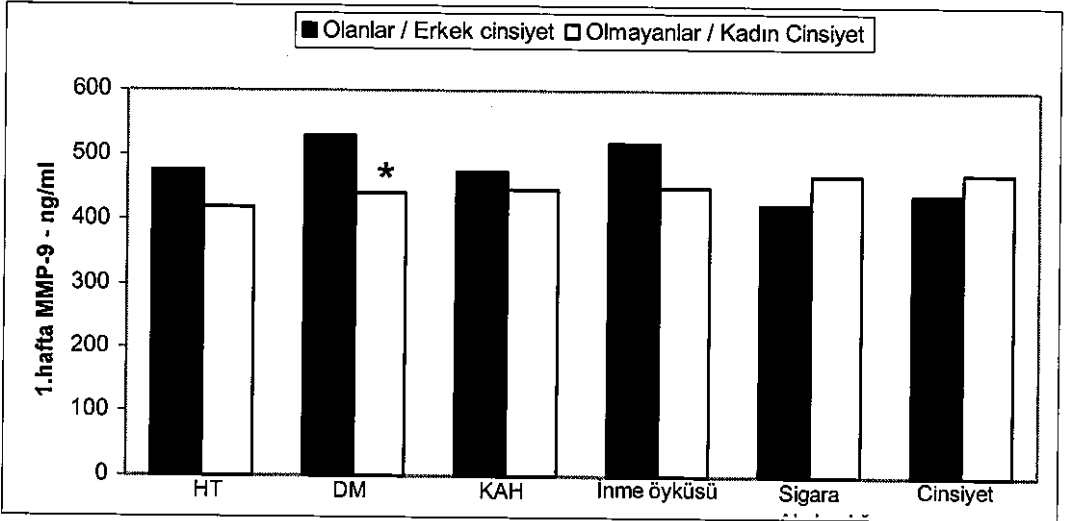
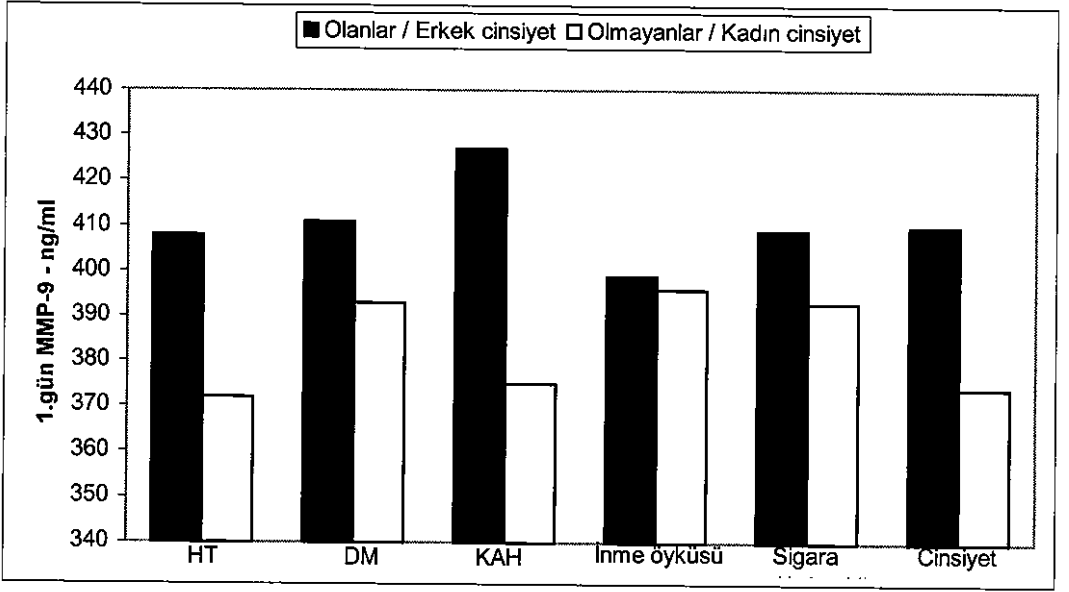


Grafik 2: Kontrol ve hasta grubunun MMP-9 değerleri

Hasta grupta, cinsiyet, vasküler risk faktörler (DM, HT, KAH, inme öyküsü, sigara alışkanlığı dikkate alındığında her üç MMP-9 ortalama değerleri için diyabetik hatalarda 1. hafta MMP-9 değerinin diyabetik olmayanlara göre daha yüksek olması ($p=0.01^*$) dışında anlamlı farklılık yoktu. Kontrol grubunda da erkeklerin ortalama MMP-9 değeri (78 ± 22 ng/ml) kadınlarınkine (89 ± 12 ng/ml) göre fazla bulundu fakat bu istatikselsel olarak anlamlı değildi ($p=0.09$). (Tablo-1, 3)

		1.gün MMP-9	p	1.hafta MMP-9	P	1.ay MMP-9	p
Cinsiyet	Kadın	374 ± 155	0.40	472 ± 105	0.29	321 ± 149	0.13
	Erkek	410 ± 172		440 ± 84		397 ± 145	
SVH öyküsü	Var	399 ± 157	0.95	519 ± 103	0.10	423 ± 123	0.29
	Yok	396 ± 155		450 ± 94		346 ± 153	
HT	Var	408 ± 174	0.31	476 ± 96	0.08	374 ± 149	0.30
	Yok	372 ± 97		420 ± 93		318 ± 151	
DM	Var	411 ± 183	0.73	530 ± 81	0.01	401 ± 70	0.20
	Yok	393 ± 148		441 ± 94		347 ± 160	
Sigara Alışkanlığı	Var	409 ± 112	0.76	424 ± 93	0.20	386 ± 139	0.49
	Yok	393 ± 163		469 ± 98		346 ± 155	
KAH	Var	427 ± 170	0.20	474 ± 99	0.36	385 ± 165	0.26
	Yok	375 ± 140		447 ± 96		328 ± 133	
AF	Var	431 ± 140	0.15	493 ± 89	0.04	378 ± 154	0.42
	Yok	373 ± 160		433 ± 97		337 ± 148	

Tablo-1: Hasta grubunun risk faktörlerine göre MPP-9 aktivitelerinin karşılaştırılması



Garfik -3: Hasta grubunun iskemik inmenin her üç döneminde risk faktörlerine göre MMP-9 aktivitelerinin grafiksel karşılaştırılması

Hasta grubunun geliş sistolik ve diastolik arteriyal tansiyon değerleri, kan şekeri, kan yağları, hemoglobin, hemotokrit, lökosit, trombosit, sedimentasyon değerleri ile her üç MMP-9 değerleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmadı (Tablo-2).

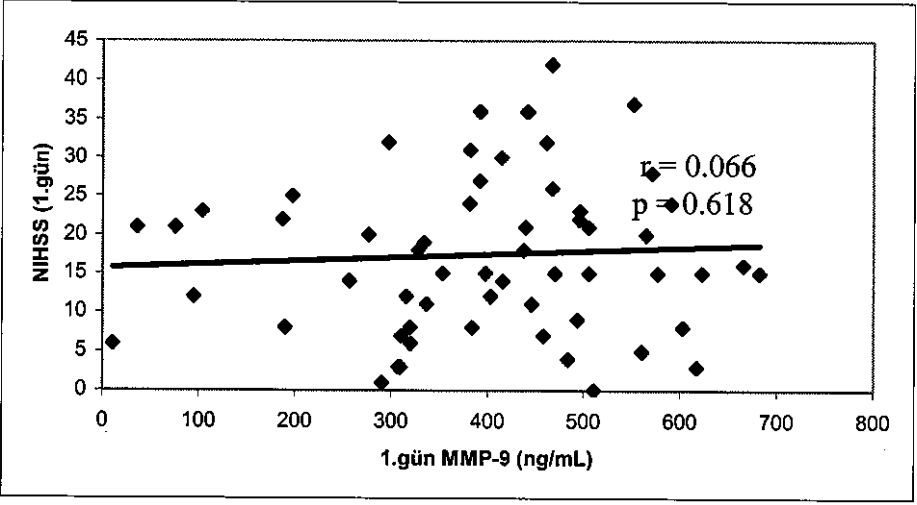
Parametre	N	1gün MMP-9		1 hafta MMP-9		1 ay MMP-9	
		r	P	r	p	r	p
Kan şekeri, mg/dl	59	-0.097	0.46	-0.098	0.52	-.053	0.75
Kolesterol, mg/dl	59	-0.015	0.913	0.13	0.37	0.11	0.48
Trigliserid, mg/dl	59	0.113	0.39	-0.124	0.42	0.202	0.23
HDL	59	-0.032	0.809	0.23	0.119	-0.074	0.664
LDL	59	-0.014	0.91	0.39	0.80	0.133	0.43
Hemoglobin	59	0.036	0.787	-0.193	0.210	0.192	0.255
Hemotokrit	59	0.084	0.527	-0.174	0.257	0.130	0.443
Lökosit, $\times 10^3/l$	59	0.182	0.167	-0.008	0.961	0.274	0.101
Trombosit	59	-0.033	0.805	-0.058	0.706	-0.074	0.66
Sedimentasyon	59	-0.024	0.860	0.165	0.284	0.081	0.635

Tablo – 2: Hasta grubunun laboratuvar değerlerinin MMMP-9 değerleri ile korelasyonu

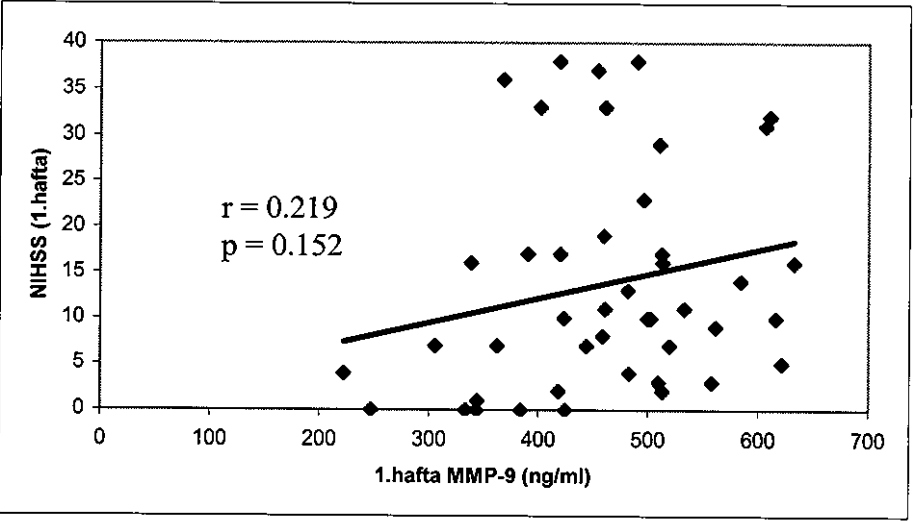
NIHSS SKORLARININ ANALİZİ:

Hasta grubunun ilk günlük ortalama NIHSS skoru 17.4 ± 10.2 (0 - 42), birinci hafta 13.7 ± 11.9 (0 - 38), birinci ay 7.9 ± 8.6 (0 - 37)'dir. Birinci gün, birinci hafta ve birinci ay NIHSS değerleri ile aynı dönemdeki MMP-9 değerleri ile değişimine bakıldığında iskemik SVH'nın her üç döneminde de hastaların NIHSS değerleri ile MMP-9 değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunmadı (1.gün $p=0.618$, 1.hafta $p=0.152$, 1.ay $p=0.192$; Grafik 4-a,b,c)

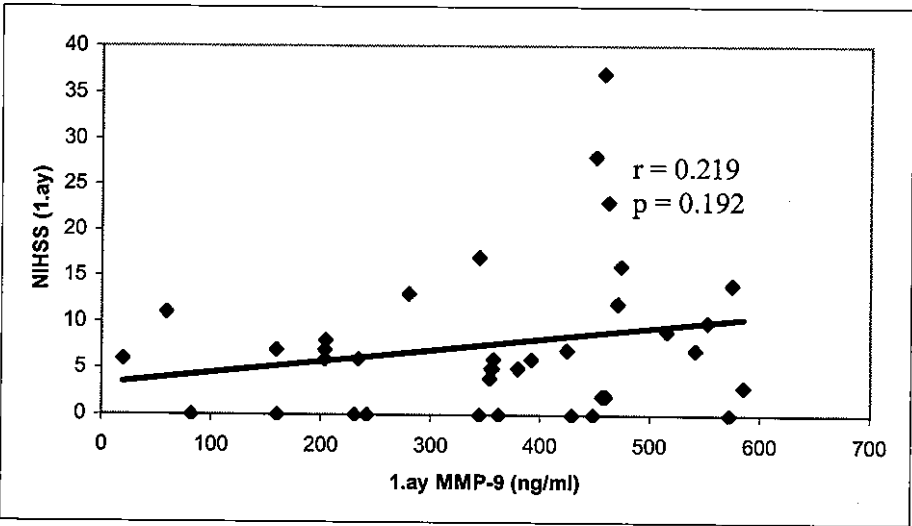
Çalışma sonunda çalışmaya alınan bütün hastaların son NIHSS'ları ile son MMP-9 değerlerine bakıldığında ise NIHSS skorundaki artış ile MMP-9 artışı arasında anlamlı korelasyon saptandı ($p=0.013$; Grafik-5)



a)

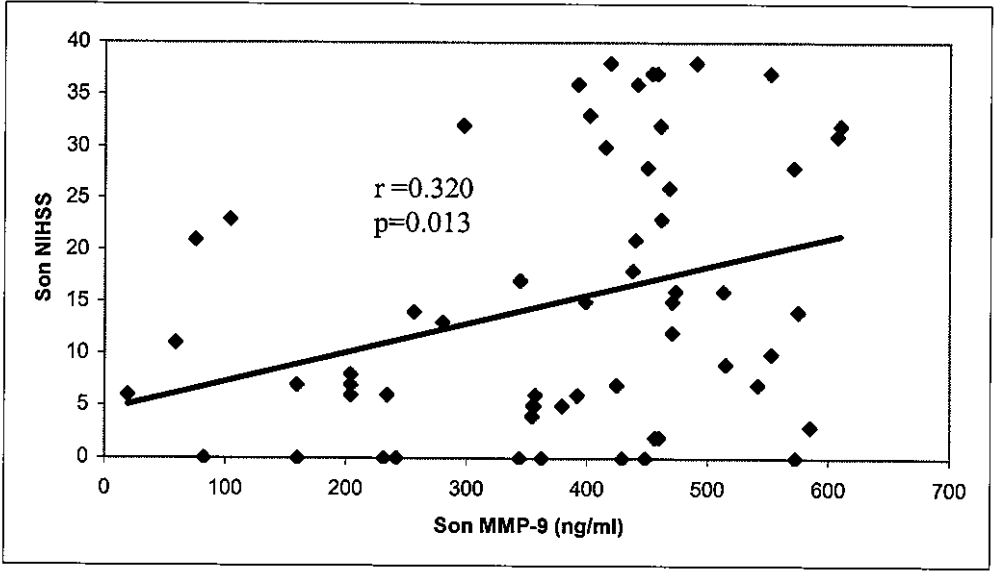


b)



c)

Grafik 4- İskemik SVH'nın üç ayrı döneminde NIHSS skorlarının aynı dönemdeki MMP-9 ile korelasyonu

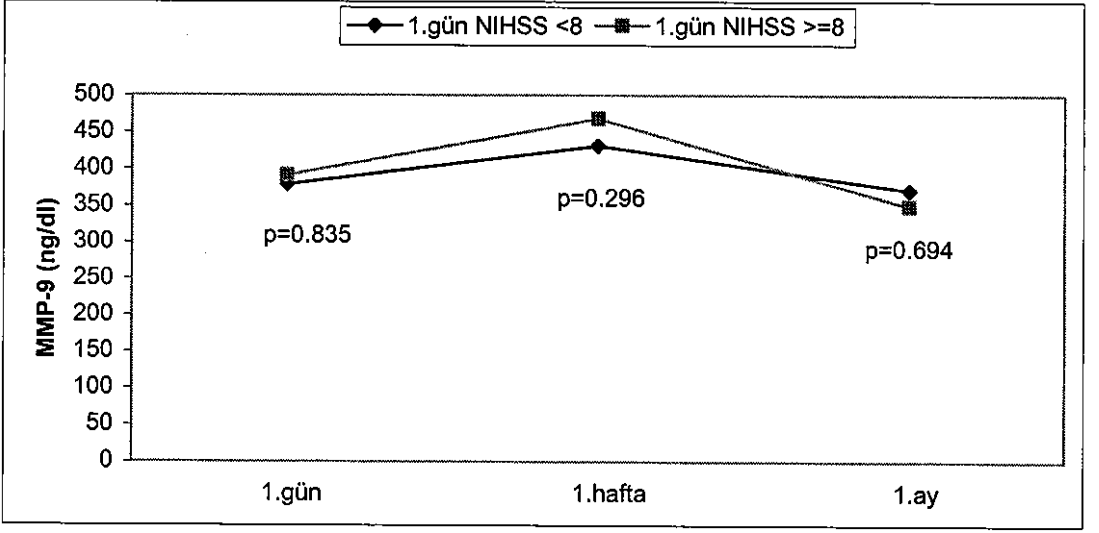


Grafik – 5: Çalışma sonunda bütün hastaların Son NIHSS ve Son MMP-9 değerlerinin korelasyonu

Üç dönem içinde hastalar inme şiddetine göre değerlendirildiklerinde, inme şiddeti hafif olanlar (NIHSS<8) ile inme şiddeti ağır olanlar (NIHSS>=8) arasında ortalama MMP-9 değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (1.gün $p=0.835$, 1.hafta $p=0.296$, 1.ay $p=0.694$; Tablo-3, Grafik – 6).

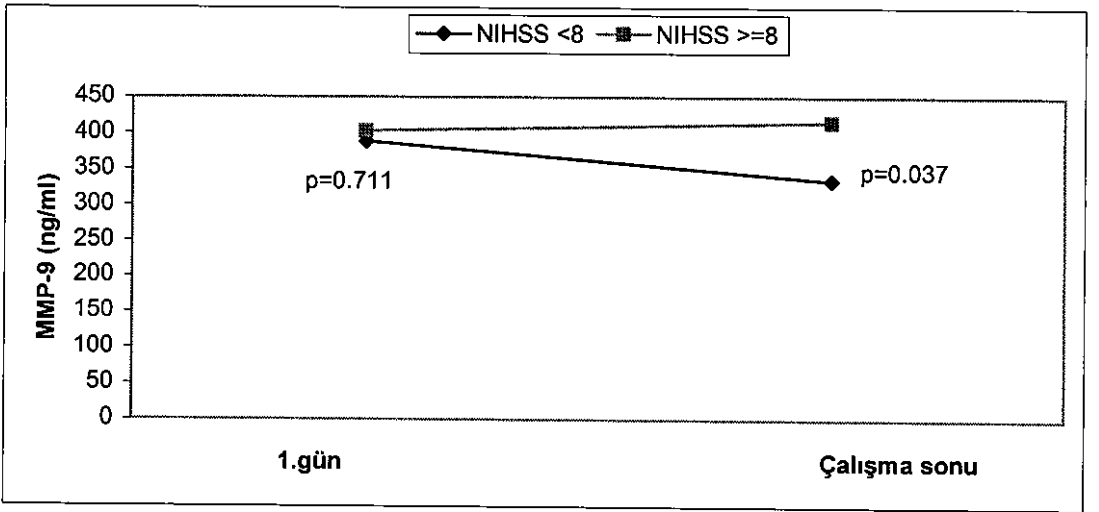
	İnme Şiddeti				
	NIHSS <8		NIHSS >=8		P
	n	ng/ml	N	ng/ml	
1.gün MMP-9	11	379.8±168.9	48	391.2±162.4	0.835
1.hafta MMP-9	11	432.5±113.1	33	468.4±92.2	0.296
1.ay MMP-9	11	371.7±158.9	26	349.9±149.5	0.694

Tablo – 3: İnme şiddetine hafif olan ve ağır olan hastaların inmenin üç ayrı döneminde MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması



Grafik – 6: İnme şiddetine hafif olan ve ağır olan hastaların MMP-9 değerlerinin grafiksel karşılaştırılması

Çalışma sonunda inme şiddeti hafif (NIHSS <8) olan hastalar birinci gün ortalama MMP-9 değeri ($388.3 \pm 156.7 \text{ ng/ml}$), inme şiddeti ağır (NIHSS ≥ 8) olan hastaların ortalama değerine ($403.5 \pm 154.2 \text{ ng/ml}$) göre anlamlı derecede farklılık göstermez iken, çalışma sonunda inme şiddeti ağır olan hastaların son MMP-9 ortalama değeri ($414.8 \pm 141.0 \text{ ng/ml}$) hafif olanlara göre ($333.9 \pm 146.8 \text{ ng/ml}$) anlamlı derecede yüksekti (1. gün için $p=0.711$, çalışma sonu için $p=0.037$, Grafik-7).



Grafik – 7: Çalışma sonunda inme şiddeti hafif olan hastaların ağır olanlara göre MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması

İki grup arasında yaş, tansiyon değerleri, laboratuvar değerleri karşılaştırıldığında İnme şiddeti ağır olan hastaların geliş kan şekeri ortalaması (132.4±52.8mg/dl) hafif olanlara (178.0±76.4mg/dl) göre anlamlı olması dışında anlamlı fark bulunmadı (p=0.013; Tablo-4). İnme şiddeti hafif olan hastaların infarkt volümü (71.5±73.0cm³) ağır olanlara göre (108.5±72.9cm³) daha az olmakla birlikte bu ilişki istatistiksel anlama ulaşmadı (p=0.059).

İnme şiddetine göre gruplar, SVH risk faktörleri açısından karşılaştırıldıklarında her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı Tablo-5).

	Çalışma sonunda inme şiddeti		
	NIHSS <8	NIHSS ≥8	P
N	25	34	
1.gün MMP-9 ,ng/ml	388.3±156.7	403.5±154.2	0.711
Çalışma sonunda MMP-9	333.9±146.8	414.8±141.0	0.037*
Yaş, yıl	61.5±15.9	64.9±11.9	0.351
Sistolik TA, mmHg	158.2±26.1	163.2±26.0	0.467
Diastolik TA, mmHg	90.4±9.3	95.8±11.8	0.060
Glukoz, mg/dl	132.4±52.8	178.0±76.4	0.013*
Kolesterol, mg/dl	199.9±57.9	211.8±61.0	0.450
Trigliserid, mg/dl	123.4±62.8	132.7±64.8	0.585
HDL, mg/dl	46.1±12.2	50.1±19.1	0.362
LDL, mg/dl	135.4±37.9	137.8±38.1	0.811
Hemoglobin, gr/dl	13.1±1.4	13.1±2	0.995
Hemotokrit , %	39.5±4.2	40.0±6.0	0.730
Lökosit, x10 ⁹ /l	9316.0±2527.7	11299.4±4840.0	0.067
Trombosit	252440.0±47208.8	269058.8±94205.4	0.422
Sedimantasyon, mm/h	26.6±21.0	21.6±14.8	0.290
İnfarkt Volümü, cm ³	71.5±73.0	108.5±72.9	0.059

Tablo – 4: İnme şiddeti hafif olan hastalar ile ağır olan hastaların diğer karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

	NIHSS <8	NIHSS >=8	p
	Sayı	Sayı	
Kadın/Erkek	16/9 (%64.0/%36.0)	19/15 (%55.9/%44.1)	0.328
SVH öyküsü	3 (%12.0)	6 (%17.6)	0.415
HT	17 (%68.0)	23 (%67.6)	0.602
DM	3 (%12.0)	5 (%23.5)	0.218
Sigara Alışkanlığı	7 (%28.0)	5 (%14.7)	0.177
KAH	10 (%40.0)	14 (%41.2)	0.517
AF	10 (%40.0)	14 (%41.2)	0.517

Tablo – 5: İnme şiddeti hafif olan hastalar ile ağır olan hastaların SVH risk faktörleri açısından karşılaştırılması

Çalışma süresince hastalar nörolojik durumlarındaki değişim dikkate alındığında NIHSS'larına göre 11 hastanın durumunda değişiklik olmadı (NIHSS'undaki değişim 4'den az), 23 hasta iyileşti (NIHSS'unda ≥ 4 azalma), 25 hastanın durumu ise kötüleşti (NIHSS'unda ≥ 4 artma). Çalışma sonunda iyileşme gösteren hastaları iyileşme göstermeyen hastalar ile karşılaştırdığımızda, çalışma sonundaki ortalama MMP-9 değeri iyileşme gösteren grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.008$, Tablo-6). Bu hastaların birinci gün MMP-9 ortalama değerleri ise iyileşme göstermeyen gruba göre farklı değildi ($p=0.700$, Tablo-6)

Yaş, tansiyon ve laboratuvar değerleri karşılaştırıldığında nörolojik iyileşme gösteren hastaların geliş kan şekeri ortalaması (133.91 ± 60.17) iyileşme göstermeyenlere (174.50 ± 73.12) göre anlamlı derecede düşük olması dışında fark yoktu ($p=0.030$; Tablo-6). SVH risk faktörleri açısından karşılaştırıldıklarında her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo-7).

	Nörolojik Durumda İyileşme NIHSS'da >=4 azalma	Nörolojik Durumda kötüleşme / Stabil NIHSS'da >=4 artma / <=4 değişiklik	p
N	23	36	
1.gün MMP-9, ng/ml	387.31±184.05	403.34±134.09	0.700
Çalışma sonunda MMP-9	317.36±163.27	420.93±123.27	0.008*
Yaş, yıl	62.30±15.63	64.31±12.55	0.590
Sistolik TA, mmHg	162.82±29.41	160.00±23.90	0.687
Diastolik TA, mmHg	95.21±11.22	92.50±11.05	0.364
Glukoz, mg/dl	133.91±60.17	174.50±73.12	0.030*
Kolesterol, mg/dl	200.43±57.73	210.89±61.07	0.515
Trigliserid, mg/dl	119.78±63.91	134.53±63.70	0.390
HDL, mg/dl	46.04±12.92	50.03±18.55	0.373
LDL, mg/dl	137.48±39.72	136.47±36.96	0.921
Hemoglobin, gr/dl	13.18±1.69	13.19±1.92	0.981
Hemotokrit, %	39.48±5.16	40.01±5.50	0.716
Lökosit, x10 ⁹ /l	9778.26±3301.78	10893.88±4553.78	0.314
Trombosit	252913.04±49588.22	267833.33±91512.52	0.477
Sedimantasyon, mm/h	25.09±22.18	22.92±14.56	0.651
İnfarkt Volümü, cm ³	81.04±68.76	100.37±78.25	0.337

	Nörolojik Durumda İyileşme NIHSS'da >=4 azalma N = 23	Nörolojik Durumda kötüleşme / Stabil NIHSS'da >=4 artma / <=4 değişiklik N = 36	p
Kadın/Erkek	14/9 (%60.9/%39.1)	21/15 (%58.3/%41.7)	1.000
SVH öyküsü	2 (%8.7)	7 (%19.4)	0.460
HT	16(%69.6)	24 (%66.7)	1.000
DM	3 (%13.0)	8 (%22.2)	0.502
Sigara Alışkanlığı	5 (%21.7)	7 (19.4)	1.000
KAH	10 (%43.5)	14 (%38.9)	0.790
AF	7 (%30.4)	17(%47.2)	0.279

Tablo – 6,7: Nörolojik durumdaki değişikliklere göre hasta gruplarının karakteristik özelliklerinin ve risk faktörlerinin karşılaştırılması

MRS İLE MMP-9 İLİŞKİSİ

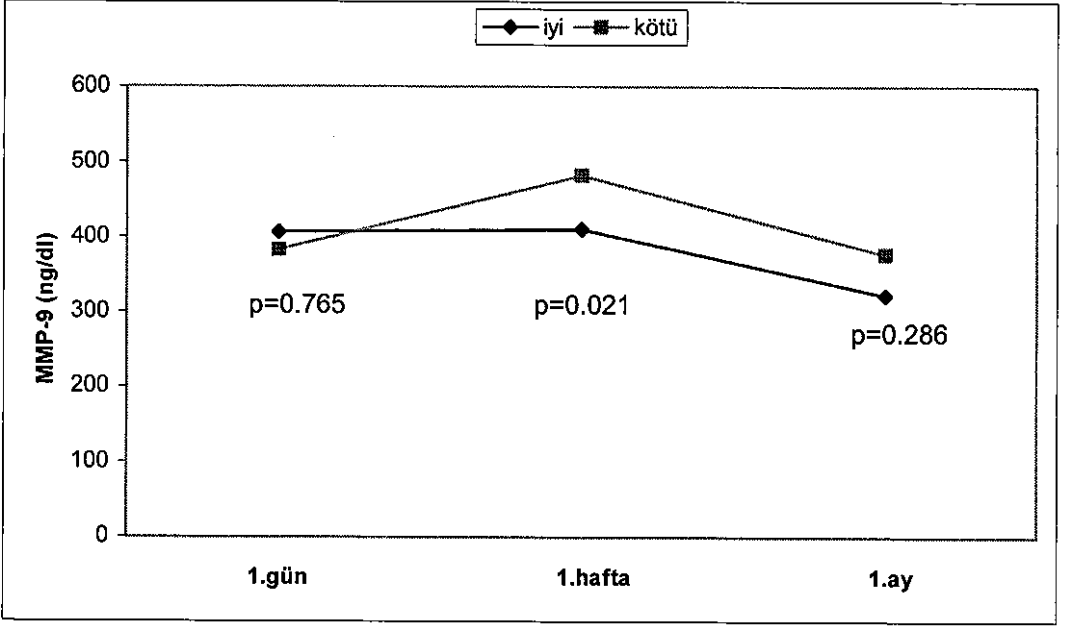
Hastalar prognozları açısından değerlendirildiğinde prognozu iyi ve kötü olan gruplar kendi içlerinde MMP-9 değerleri açısından anlamlı farklılık gösterdi (prognozu iyi olan grup için $p=0.037$, kötü olan grup için $p=0.019$). Her iki grup bir birleri ile karşılaştırıldığında; 1.gün ve 1.ay ortalama MMP-9 değerleri arasındaki iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken, 1. hafta ortalama MMP-9 değeri prognozu kötü olan grupta iyi olan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.021$, Tablo-8).

Yaş, tansiyon ve laboratuvar değerleri dikkate alındığında prognozu kötü olan hastaların geliş kan şekeri değeri ($170.91\pm72.86\text{mg/dl}$) prognozu iyi olan hastalara ($119.36\pm46.40\text{mg/dl}$) göre daha yüksekti ($p=0.016$, Tablo-9). İnfarkt volümü ise prognozu kötü olan hastalarda anlamlı derecede daha fazla olarak bulundu (prognozu kötü grupta $104.57\pm74.23\text{ cm}^3$, iyi olan grupta $55.107\pm65.02\text{ cm}^3$ $p=0.029$). Diğer parametreler açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo-9).

Prognoza göre gruplar, SVH risk faktörleri açısından karşılaştırıldıklarında her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo-10).

	Prognoz İyi MRS \leq 2	Prognoz Kötü MRS $>$ 2	p
1.gün MMP-9	407.96 \pm 183.41	393.716 \pm 146.06	0.765
1.hafta MMP-9	410.40 \pm 113.03	482.38 \pm 82.06	0.021*
1.ay MMP-9	322.15 \pm 135.15	377.28 \pm 158.38	0.286
Son MMP-9	322.152 \pm 135.15	398.73 \pm 148.39	0.091

Tablo – 8: Prognoza göre MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması



Garfik – 8: Prognosa göre MMP-9 değerlerinin grafiksel karşılaştırılması

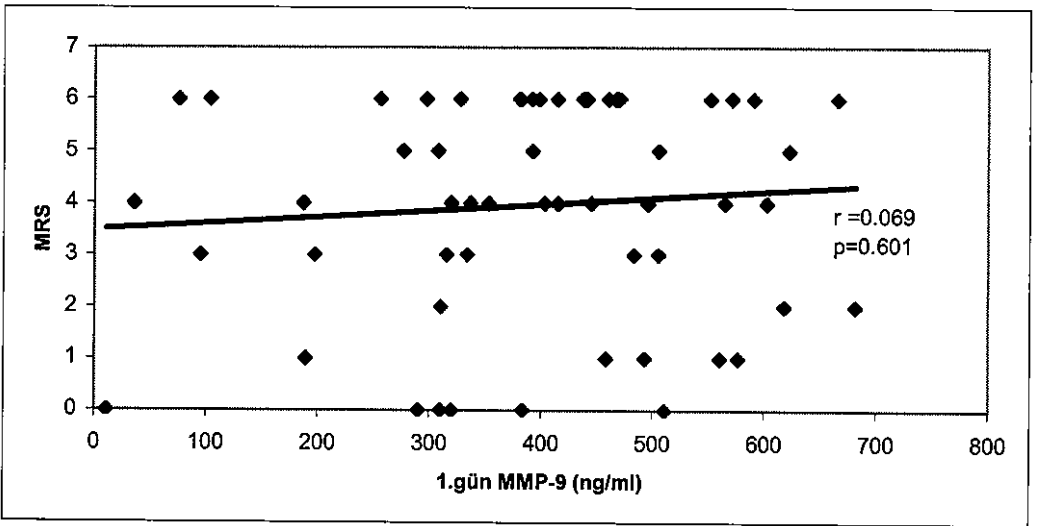
	MRS		p
	İyi prognoz (MRS≤2)	Kötü prognoz (MRS>2)	
N	14	45	
1.gün MMP-9	407.96±183.41	393.716±146.06	0.765
Çalışma sonunda MMP-9	322.152±135.15	398.73±148.39	0.091
Yaş, yıl	59.86±16.1	64.67±12.90	0.256
Sistolik TA, mmHg	158.92±26.03	161.77±26.22	0.723
Diastolik TA, mmHg	92.14±10.50	94.00±11.36	0.589
Glukoz, mg/dl	119.36±46.40	170.91±72.86	0.016*
Kolesterol, mg/dl	199.86±72.52	208.98±55.62	0.621
Trigliserid, mg/dl	140.64±72.93	125.09±60.90	0.429
HDL, mg/dl	44.36±9.6	49.76±18.10	0.291
LDL, mg/dl	137.93±44.88	136.53±35.78	0.905
Hemoglobin, gr/dl	13.08±1.14	13.22±1.99	0.809
Hemotokrit, %	39.40±3.66	39.93±5.78	0.751
Lökosit, x10 ⁹ /l	9942.85±3377.46	10619.55±4343.00	0.596
Trombosit	245000.0±54346.4	267311.1±83478.3	0.353
Sedimantasyon, mm/h	22.00±17.23	24.31±18.09	0.675
İnfarkt Volümü, cm ³	55.107±65.02	104.57±74.23	0.029*

Tablo – 9: Prognosa göre grupların karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

	İyi prognosis (MRS≤2)	Kötü prognosis (MRS>2)	P
	N = 14	N = 45	
Kadın/Erkek	7/7 (%50.0/%50.0)	28/24 (%62.2/%37.8)	0.536
SVH öyküsü	1 (%7.1)	8 (%17.8)	0.671
HT	8(%57.1)	32 (%71.1)	0.345
DM	1 (%13.0)	10 (%22.2)	0.269
Sigara Alışkanlığı	5 (%35.7)	7 (15.6)	0.133
KAH	6 (%42.9)	18 (%40.0)	1.000
AF	6 (%42.9)	18(%40.0)	1.000

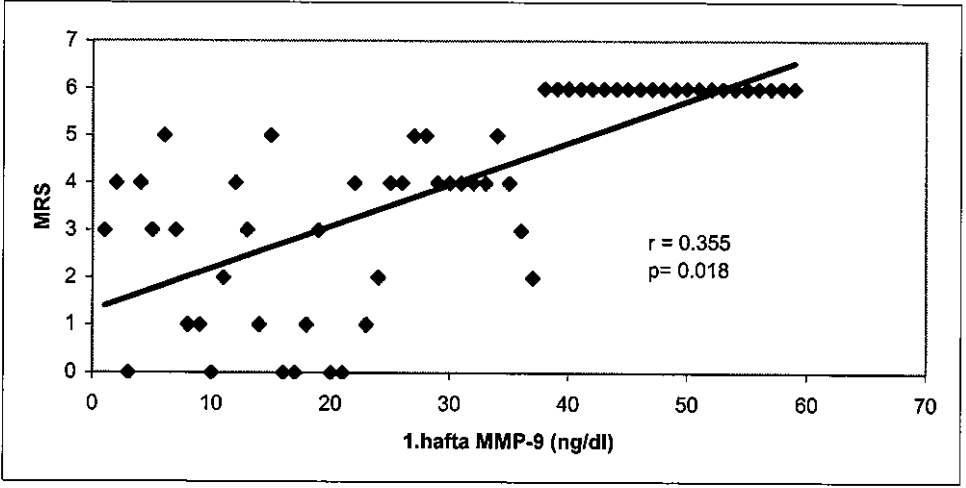
Tablo – 10: Prognoza göre grupların SVH risk faktörleri açısından karşılaştırması

MRS'na göre yapılan korelasyon testlerinde birinci günde MMP-9 değerleri ile MRS arasında her hangi bir korelasyon bulunmazken, birinci hafta, birinci ay ve çalışma sonu MMP-9 değerleri ile hastaların MRS değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu (1.günde p=0.601, 1.haftada p=0.018, 1.ayda p=0.014, çalışma sonu p=0.005, Grafik – 9 a, b, c, d).

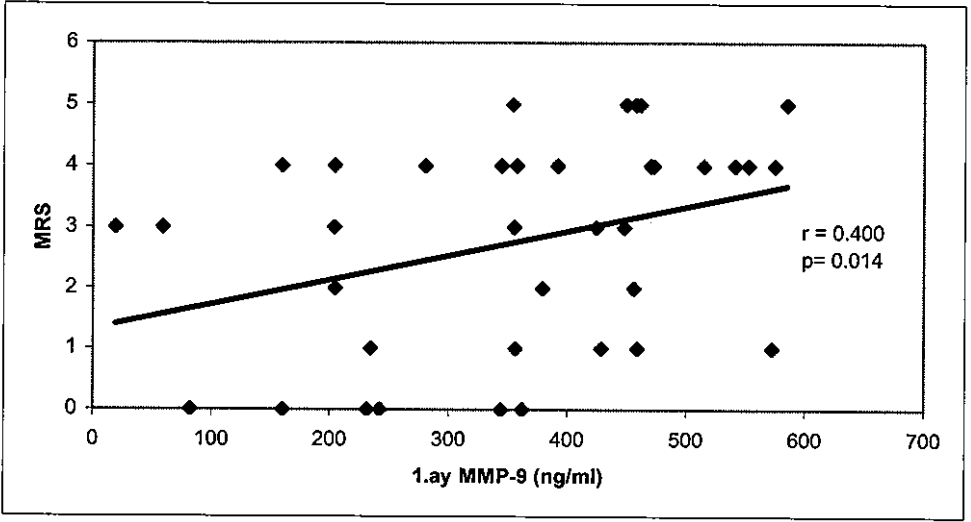


a)

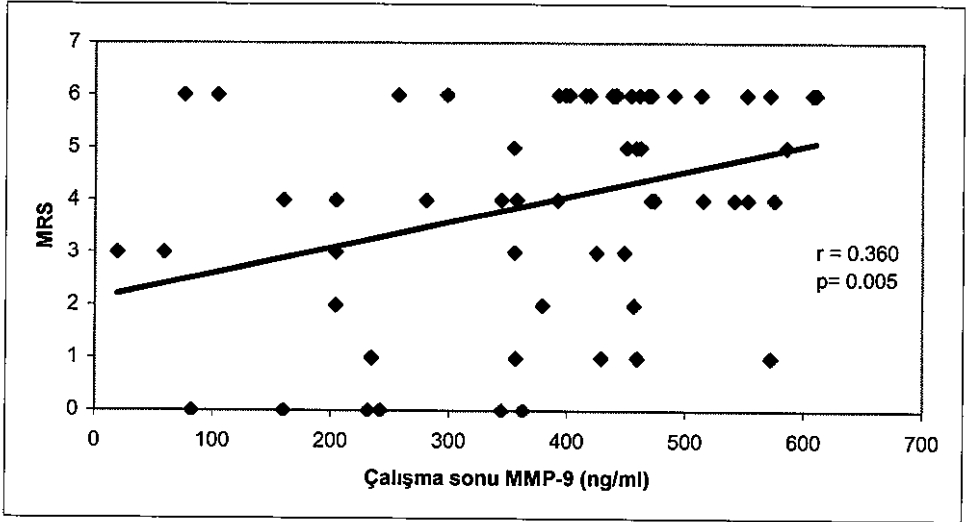
Grafik – 9: MRS ve MMP-9 korelasyonu



b)



c)



d)

Grafik – 9: MRS ve MMP-9 korelasyonu

Çalışma süresince ilk hafta içinde 15 hasta, 2-4. hafta içinde 7 hasta olmak üzere toplam 22 hasta öldü. Çalışma sonunda hayatta kalan ve ölen hastaların verileri karşılaştırıldığında, ölen hastaların geliş kan şekeri ve infarkt volumünün yaşayanlara göre daha yüksek olması dışında fark saptanmadı (Tablo- 11,12).

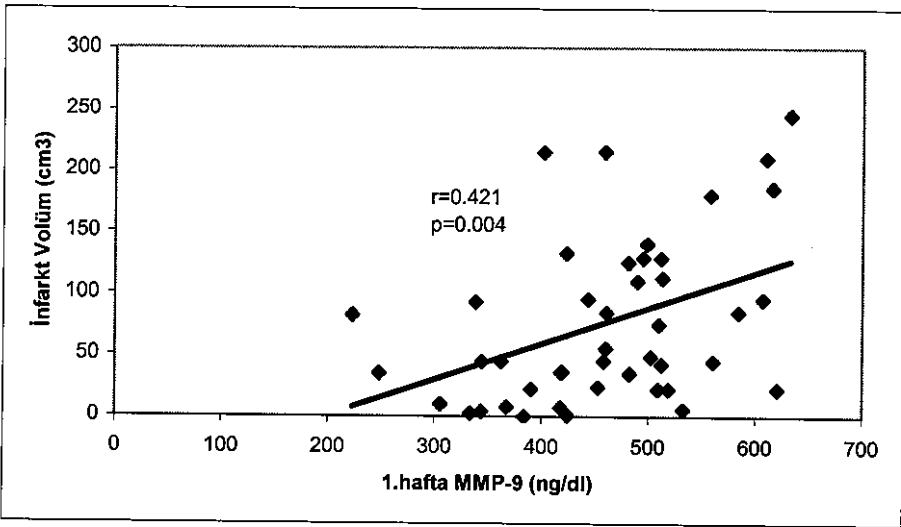
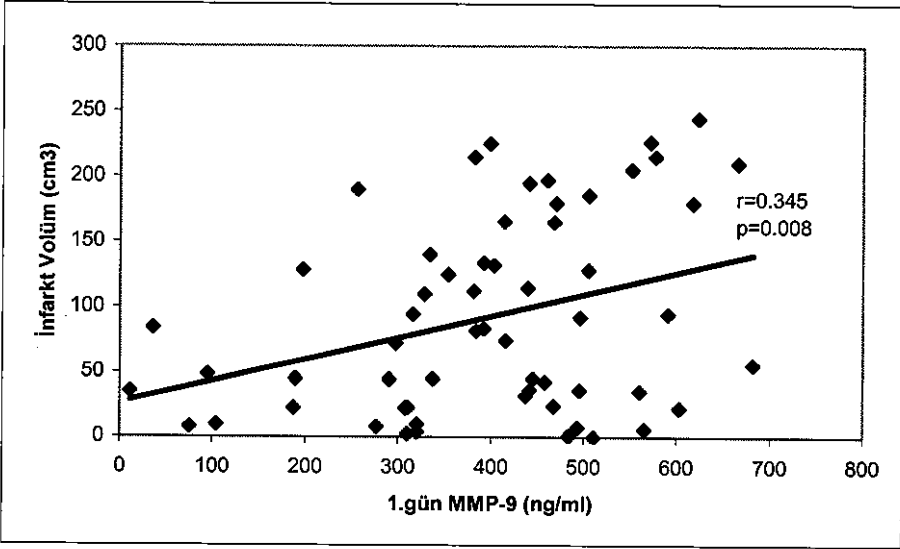
	Yaşayanlar	Ölenler	p
N	37	22	
1.gün MMP-9, ng/ml	389.1 ± 163.3	410.4 ± 139.8	0.613
Çalışma sonunda MMP-9	356.4±150.5	421.1±137.2	0.105
Yaş, yıl	63.4 ± 163.3	63.7 ± 13.4	0.932
Sistolik TA, mmHg	159.86±28.63	163.18±21.24	0.639
Diastolik TA, mmHg	92.43±11.64	95.45±10.10	0.316
Glukoz, mg/dl	140.6 ± 57.3	189.0 ± 81.3	0.010*
Kolesterol, mg/dl	197.2 ± 51.3	222.9 ± 69.4	0.109
Trigliserid, mg/dl	120.6 ± 58.7	142.5 ± 70.4	0.204
HDL, mg/dl	46.7± 11.9	51.3 ± 22.3	0.306
LDL, mg/dl	133.7 ± 35.9	142.1 ± 40.8	0.413
Hemoglobin, gr/dl	13.1 ± 1.6	13.2 ± 2.1	0.939
Hemotokrit, %	39.5 ± 4.9	40.1 ± 5.9	0.692
Lökosit, x10 ⁹ /l	9802.9 ± 3004.9	11562.2 ± 5413.0	0.113
Trombosit	254864.8 ± 65990.8	274045.4 ± 94738.4	0.364
Sedimentasyon, mm/h	25.2 ± 20.1	21.2 ± 12.9	0.411
İnfarkt Volümü, cm ³	69.0 ± 64.1	132.8 ± 75.3	0.001*

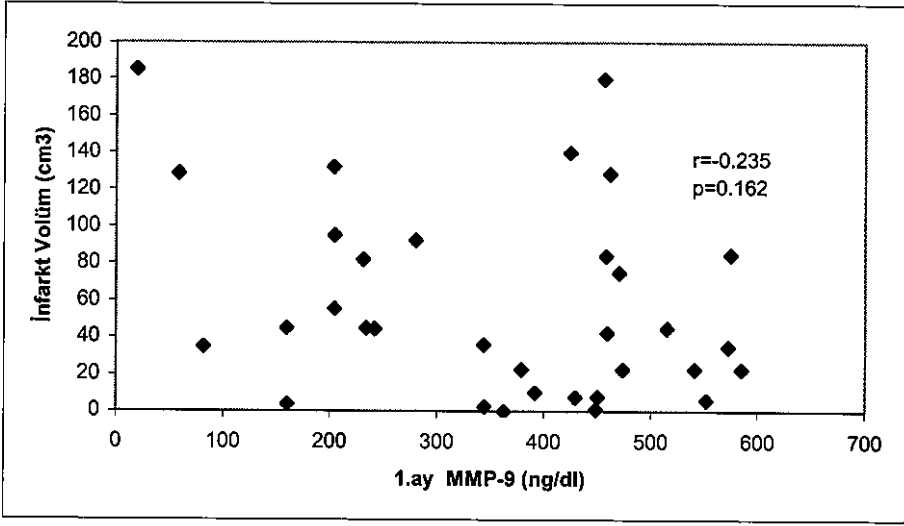
	Yaşayan	Ölen	p
Kadın/Erkek	20/17 (%54.1/%45.9)	15/7 (%68.2/%31.8)	0.214
SVH öyküsü	5 (%13.5)	4 (%18.2)	0.448
HT	25 (%67.6)	15 (%68.2)	0.598
DM	6 (%16.2)	5 (%22.7)	0.385
Sigara Alışkanlığı	9 (%24.3)	3 (%13.6)	0.261
KAH	18 (%48.6)	6 (%27.3)	0.086
AF	17 (%45.9)	7 (%31.8)	0.214

Tablo – 11,12: Çalışma sonunda yaşayan ve ölen hastaların karakteristik özellikleri ve risk faktörlerinin karşılaştırılması

İNFARKT VOLÜMÜ VE MMP-9 ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çalışmamızda tüm hastaların ortalama infarkt volümü $92.83 \pm 74.7 \text{ cm}^3$ olarak bulundu. MMP-9 ve infarkt volümü arasındaki ilişki inmenin üç döneminde değerlendirildi. Birinci gün ve birinci hafta MMP-9 değerleri ile infarkt volümü arasında pozitif korelasyon bulunurken, birinci ay MMP-9 değerleri ile infarkt volümü arasında korelasyon bulunmadı (1.gün için $p=0.008$, 1.hafta için $p=0.004$, 1.ay için $p=0.162$; Grafik - 10 a, b,c,)

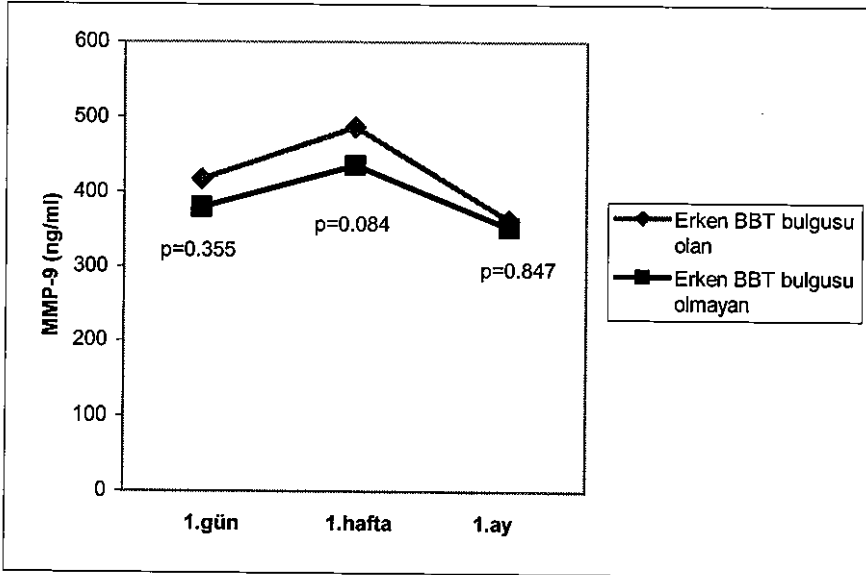




c)

Grafik – 10: MMP-9 değerlerinin infarkt volümü ile korelasyonu

Hastaların ilk 24 saat içinde çekilen BBT görüntülemelerinde erken infarkt bulguları olanların olmayanlara göre MMP-9 değerleri fazla olmakla birlikte bu fark her üç dönemde de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (1.gün için $p=0.355$, 1.hafta için $p=0.084$, 1.ay için $p=0.847$, Grafik -11).



Grafik – 12: BBT bulgularına göre MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması

TARTIŞMA

Matrix metalloproteinazlar diğer proteazlar gibi hücrel aktiviteri çeşitli yollarda kontrol eden endopeptidazlardır. Temel fonksiyonları ekstraselüler matriksin yıkımını sağlamaktır. Bunun yanı sıra hücre adhezyonunda, ekstraselüler matrixde yığılmış moleküllerin parçalanmasında ve ekstraselüler ortamdan sinyal taşınmasında etkili olan hücre yüzeyi proteinlerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alırlar (88, 89). Bu gibi fonksiyonlar ile MMP'ların klasik olarak yeniden tasarım ve hemostaz gibi önemli hücrel faaliyetlere ve çok çeşitli fizyolojik, patolojik proseslere katkıda bulunmaktadır.

Günümüzde MMP'ların, santral sisteminde de bir çok normal ve patolojik fonksiyonda katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. MMP'lar, normal nöronal gelişim sırasında hücre migrasyonuna, nörit büyümesi ve miyelinizasyon işlevlerine iştirak ederek önemli rol oynarlar.

MMP'ların bir kısmı düşük seviyelerde SSS'de bulunabilirken, çoğu nöronal hasar sırasında miktar ve fonksiyonca artış gösterirler (90, 91, 92). Serebral patolojik proseslerden biri olan iskemik serebrovasküler olaylarda MMP'ların artışı, ilk kez 1996 yılında Rosenberg G.A. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, hipertansif farelerde kalıcı orta serebral arter oklüzyonu ile iskemi oluşturulduktan sonra beyin dokusunda zimografik yöntemle ile gösterilmiştir (93). Takip eden yıllarda, deneysel hayvan modellerinde serebral iskemide MMP'ların arttığı görüşü desteklenerek, MMP'ların fizyolojik proteolitik aktiviterinin patolojik bir prosese nasıl dönüştüğü ve bunun iskemik nöronal hasardaki önemini belirlemeye yönelik bir çok çalışma yapılmıştır.

Serebral iskemide, serebral kan akımının uzun bir süre yada kalıcı olarak kesilmesi hassas beyin bölgelerinde belirli nöron hasarına yada lokalize beyin dokusu kaybına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, serebral endotelial hücre, astrosit, nöron ve bu yapılar boyunca uzanan ekstraselüler matriksten oluşan nörovasküler ünitenin, beyin yapısını korumadaki fonksiyonunu ortaya koymaktadır ve bu yapının bozulması beyin hasarı ile sonuçlanmaktadır (94, 95). Ekstraselüler matriks ve basal membran

komponentlerinden olan tip IV kolajen, heparan sulfat proteoglikan, laminin ve fibronektinin hasar görmesi mikrovasküler yapıyı ve hemostazı bozmaktadır. İskemik SVH'larda, bu protein ve polisakkaridlerden oluşan ekstraselüler matrix MMP'lar tarafından parçalandığı gösterilmiştir (96, 97, 98). Çalışmalar ile MMP ailesinin önemli bir grubu olan jelatinaz grubunun (MMP-2 ve MMP-9) ve özellikle MMP-9'un serebral iskemide etraselüler matriks komponentlerinin parçalanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (99, 100, 101,102). MMP-9 basal laminanın jelatin, kolojenler, elastin, vitronectini parçalayarak kan beyin bariyerinin bozulmasında ve dolayısı ile vasojenik ödem oluşumunda etkili olmaktadır (103).

Fokal iskemiden sonra iskemik alanda MMP-9 zamansal değişiminin araştırıldığı çalışmalarda, MMP-9 ekspresyonunun, vasojenik ödemin gerçekleştiği iskeminin birinci ve ikinci günü ile eş zamanlı olacak şekilde iskeminin erken döneminde (ilk 24 saat) arttığı gösterilmiştir (79, 82, 93). MMP-9 ekspresyonun zaman içindeki değişimi ayrıca hayvan çalışmalarında, çalışma yöntemi ve iskemik modele göre de değişmektedir. Fujimura M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada farelerde altmış dakikalık geçici iskemiden üç saat sonra MMP-9'un aktivitesinde artma saptanmıştır (104). Gasche Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kalıcı oklüzyon sonucu gelişen iskemik inme modellerinde MMP-9 artışı iskemi başlangıcından 2 saat sonra tespit edilmiştir (82).

Klinik çalışma olarak ilk kez Montaner J. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, MMP-9 artışı, orta serebral arter oklüzyonuna bağlı akut inme geçiren hastalarda, hayvan çalışmalarındaki sonuçlara benzer şekilde ilk 12 saat içinde başladığı 48 saat içinde devam ettiği gösterilmiştir (85). Takip eden bir çok çalışma ile bu bulgu klinik olarak desteklenmiştir (102, 103, 105).

MMP-9 artışının iskemik serebrovasküler olayın geç dönemi hakkındaki bilgi sadece beyin dokusu incelemeleri sonucu elde edilen bilgiler ile sınırlıdır. Romanic ve arkadaşları farelerde orta serebral arter tam oklüzyonunda sonra 6, 12, 24. saatlerde ve 5, 15, 30. günlerde iskemik beyin dokusunda MMP-9 ekspresyonunu Western blot ve zimogram analiz yöntemleri ile araştırmış ve MMP-9 aktivitesinin 24. saatte maksimuma ulaştığı 5 gün boyunca yüksek seyrettiği ve 15. günde ise normale döndüğü gösterilmiştir (106). Benzer bir çalışma Rosenberg ve arkadaşları tarafından farelerde 2 saatlik orta serebral arter oklüzyonundan sonrasında reperfüzyon sağlanarak 3, 6, 15,

24, 48, 120, 336. saatlerde kuantitatif zimogramlar hazırlanarak yapılan araştırmada MMP-9 seviyesinin 15. saatten sonra artığı 48 saatte maksimumuna ulaştığı sonrasında belirgin olarak azaldığı tespit edilmiş (93).

İnsanlarda iskemik serebrovasküler hastalık sonrası kronik dönmede MMP-9 aktivitesi Clark AW ve arkadaşları tarafında araştırılmıştır. Çalışmaya iskemik olaydan 2 gün sonra ve birkaç yıl sonra ölen toplam 8 hasta alınarak, iskemik ve normal beyin dokusundaki MMP-9 aktivitesi jelatin zimografi yöntemi kullanılarak tespit edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Hayvan deneylerinden farklı olarak inmeden aylar sonra da iskemik alanda belirgin MMP-9 aktivitesi saptamışlardır (77).

Horstmann S. ve arkadaşlarının supratentoriyal akut embolik iskemik serebrovasküler olay geçiren 50 hastada MMP aktivitesi ve farklı tedavilerin bu aktivitenin üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada zimografi yöntemi ile MMP-9'un ilk günde belirgin olarak arttığını ve 12 gün boyunca yüksek seviyede kaldığını göstermişlerdir (102). Ancak kronik dönemde MMP-9 değerlerinin nasıl seyrettiği ve bunun prognozla olan ilişkisinin gösterildiği bir klinik çalışma henüz yoktur.

Bu çalışmada iskemik serebrovasküler hastalık geçiren hastalarda akut, subakut ve kronik dönemde aktif MMP-9 saptanarak, MMP-9 seviyesinin inme şiddeti, kranial görüntülemelerde infarkt alanı büyüklüğü, inme risk faktörleri ve akut dönemdeki hemodinamik durum, biyokimyasal özellikler ile ilişkisi değerlendirilmiştir. MMP-9 seviyesi iskemik olayın her üç döneminde de normallere göre yüksek bulunmuştur. İlk günde kaydedilen yüksek MMP-9 seviyesi ilk hafta içinde artmaya devam etmiştir. Kronik dönemde ise MMP-9 seviyesi belirgin olarak düşmekle birlikte halen normallerin üzerinde kaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızın tespit ettiğimiz bu sonuçlar MMP-9'u iskeminin erken ve geç döneminde önemini göstermektedir.

Çalışmamızda daha önceki çalışmalar ile benzer şekilde iskemik SVH'larda MMP-9'un ilk günden itibaren artığı gösterilmesinin dışında diğer çalışmalardan farklı olarak, iskemik inmenin ilk birinci haftası boyunca MMP-9 değerlerinin yüksek olduğunu gösteren ilk klinik çalışma olması açısından önem göstermektedir. Bu yükselmenin birinci ay sonunda normal değerlere dönmeyip halen yüksek kaldığı fakat ilk birinci hafta değerlerine oranla anlamlı olarak düşme gösterdiğini de saptamış olduk. Bu bulguların şimdiye kadar yapılmış ilk birinci hafta ve birinci ay sonuçları olması bakımından önem arz etmektedir..

Geç dönem serebral iskemide MMP-9 aktivitesinin araştırıldığı hayvan çalışmalarından 15.günden sonra MMP-9 aktivitesinin normal yada normale yakın tespit edilirken çalışmamızda 30 gün gibi geç dönemde de MMP-9 seviyesinin halen daha normallerden yüksek tespit edilmesi çelişki gibi gözükabilir. Fakat doğal şartlar altında trombus yada embolizasyon ile oluşan iskeminin hayvan deneylerinde kullanılan mekanik tıkanma yöntemi ile oluşan iskemiden farklı olabileceği ve sonuçlarının bire bir karşılaştırılamayacağını düşünmekteyiz.

Nitekim Toshiaki A. ve arkadaşları, deney hayvanlarında orta serebral arterin mekanik olarak tıkanması sonucu oluşan iskemik hasarın doğal şartlarda gerçekleşen ateroskleroz plak nedeni ile damarların tıkanması ile oluşan iskemik hasar ile aynı sonuçlanmayacağını ileri sürerek yaptıkları çalışmada farelerde iki ayrı iskemi modeli kullanılarak sonuçları karşılaştırmışlardır. Modellerin birinde mekanik olarak orta serebral arterin tıkanması ve sonra reperfüzyonun tekrar sağlanması ile oluşan iskemi oluşturulmuş, diğerinde ise emboli ardından tromboliz ile reperfüzyon gerçekleştirilerek iki ayrı metot üzerinde çalışmışlardır. Her iki metoda arasında serebral kan akımının yeniden sağlanması, kan beyin bariyerinde meydana gelen sızıntı ve MMP-9 regülasyonunda farklılıklar olduğu saptanmıştır. Mekanik tıkanmanın olduğu modelde tıkanmanın kaldırılması ile perfüzyon hızlı olarak düzelmekte ve hatta birkaç dakika sonra, artmış kan akımına bağlı hiperemi gerçekleşmektedir. Buna karşın emboli sonrası tPA ile trombolizin yapıldığı modelde reperfüzyon iskeminin merkezinde zayıf iken iskemi etrafında yavaş bir iyileşme gözükmektedir. Her iki model sonucunda iskemik alanın büyüklüğü aynı iken, zimgrafik analiz sonucu saptanan MMP-9 seviyesi embolik modelde tüm iskemik alanda oldukça yüksek olarak saptanırken mekanik tıkanmanın olduğu modelde iskemik alanın sadece merkezinde artmış olarak saptanmıştır (107).

Her iki iskemi modelindeki sonuçların farklı olmasının nedenlerinden biri, emboli modelindeki pıhtının MMP-9 üretimini stimüle eden trombin gibi koagülasyon faktörleri içermesi olabilir (101, 108) Ayrıca reperfüzyonu sağlayan tPA bir plasminojen aktivatorüdür ve plasmin oluşumunu sağlar. Bu nedenle plasminin MMP-9 u aktive etmesi nedeni ile de embolik metot ile oluşan serebral iskemide mekanik tıkanmaya göre daha yüksek MMP-9 seviyesi tespit edilmiş olabileceği düşünülebilir (63, 109). Çalışmamızda hiçbir hastaya tPA verilmemiş olması nedeni ile tPA'a bağlı

MMP-9 aktivasyonu söz konusu değildir. Fakat iskemi nedeni serebral damarların trombüs ile tıkanması olduğundan, serebral iskemi prosesinde MMP-9 seviyesini artıran mekanizmalar arasında, serebral kan akımının azalması dışında, trombotik durumun kendisine ait faktörlerinde etkisi olabileceği açıkça ortadadır.

Kronik dönemde MMP-9 seviyesinin araştırıldığı diğer çalışmalar ile çalışmamızda arasında MMP-9 elde edilmek üzere kullanılan teknikler açısından fark vardır. Çalışmalarda proMMP-9 enzimatik aktivasyonunun hücre yüzeyine bağlanarak gerçekleştiği ve hemen sonra aktive edilmiş enzimin aşırı aktiviteyi engellemek amacıyla hızla ortamdaki kaldırıldığı gösterilmiştir (110). Bu nedenle daha önce bir çok çalışmada kullanılan zimografi yöntemi ile herhangi bir zamanda dokularda, aktif MMP-9 sadece düşük seviyelerde tespit ediliyor olabilir (80). MMP aktivasyonunu ölçmek için geliştirilmiş ELISA yöntemleri vardır ve son yıllarda bir çok çalışmada başarı ile kullanılmaktadır (85, 111). Bizim çalışmamızda da MMP-9 analizi için hassas bir yöntem olan ELISA yönteminin kullanılmıştır.

İskemik serebrovasküler olayda hangi mekanizmaların MMP-9 artışına sebep olduğunu ve MMP'lerin infarkt oluşmuş beyin parankimindeki hasara nasıl neden olduklarını araştırmak üzere bir çok hayvan çalışması planlanmış ve yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda MMP-9'da kaydedilen artış, endojen olarak astrosit ve mikroglialardan kaynaklanabileceği gibi ekzojen olarak beyin dokusuna giren nötrofil ve makrofajlardan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (77, 78).

MMP-9 provake edilmiş şartlarda çeşitli beyin hücreleri tarafından üretilmektedir. Astrositler ve mikroglial hücreler proinflamatuvar ajanların stimülasyonu sonrası MMP-9 üretirler (112, 113, 114). Hasar sonrasında serebral kapillerlerin de MMP-9 ürettikleri gösterilmiştir (115, 116). Nötrofillerde ayrıca stimulanlara cevap olarak MMP-9 salgılar (117, 118). Antony D.C. ve arkadaşlarının postmortem beyin dokusunda yaptıkları çalışmada akut dönemde kaybedilen beş hastadan alınan iskemik beyin dokusu örneğinde nötrofillerde MMP-9'un belirgin olarak arttığını göstermişlerdir (119, 120). Montaner J ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MMP-9 artışı ile nötrofil sayısı arasında korelasyon tespit etmişlerdir (85). Fakat MMP-9 ve nötrofil ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada bu korelasyon kurulamamıştır (121). Bizim çalışmamızda hastaların birinci gün kaydedilen lökosit sayıları ile MMP-9 yüksekliği arasında bir ilişki gösterilememiştir. Ancak bu durum nötrofiller ile MMP-9 arasında ilişki

olmadığını anlamında gelmeyeceği ve nötrofilleri iskemik inmede önemsiz hale getirmediğini düşünmekteyiz.

Akut iskemik SVH'ların bir sonucu da, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasıdır (122, 123). Bu sitokinler serebral iskeminin erken döneminde fakat geçici olarak salınırlar salınırlar (124). TNF- α ve IL-1 β daha kalıcı olan IL-6 ve IL-8 tarafından yönlendirilen sekonder inflamatuvar cevabı indükler. Bu sitoinler endotelial hücrelerde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu sağlayarak fokal iskemik lezyon içine polimorfonükleer hücreler, lökositler ve monositlerin invazyonunu sağlar (125). İnflamatuvar hücreler infiltrasyonu toksik oksijen radikallerin ve ödemin oluşumu neden olarak beyin hasarını arttırmaktadır (126). Günümüzde inflamatuvar sitokinler ve MMP-9 arasında ilişki giderek daha açık bir şekilde anlaşılmaktadır. MMP-9 gen lokusunun promoter bölgesi bir çok proinflamatuvar stokinin uyarısına hassas olan aktive protein 1 (AP-1) ve nüklear faktör κB içermektedir. AP-1'in acil cevap genleri olan *c-fos* ve *c-jun*, MMP-9 aktivasyonundan sorumlu bölümü oluşturmaktadır. Böylece TNF- α ve IL-6 gibi sitokinler MMP-9'un üretimini stimule etmektedirler (127, 128, 129,130).

MMP'ların serebral damarları komprese eden ödeme ve lökosit infiltrasyonuna neden olması, iskemik inmede meydana gelen hasarın anahtar mekanizmaları oluşturmaktadır. Endotelial hücrelerin MMP-9 başta olmak üzere, MMP salgıladığı ve dolayısıyla bazal membranın yıkımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (5,40). Damar yapısını destekleyen bazal membranın ve ekstraselüler matriksin komponentlerinin preoteolizisi, vasküler geçirgenliğin artması ve vasküler bütünlüğün kaybı ile sonuçlanır. Ek olarak bazal membranın degregasyonu, kan damarlarının nötrofillere geçirgen olmasına ve beyin dokusuna ekstaravasyonuna yol açar. Ayrıca nötrofiller dolaşımdan dokuya geçerken invazyonunu sağlamak üzere MMP-9 kullanmaktadırlar. Daha sonraki MMP-9 ekspresyonu ise makrofajların iskemik dokuya geçmesine ve yara iyileşmesine ve rezolüsyon fazında hücre artıklarının temizlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Çalışmamızda iskemik serebrovasküler olayın kronik döneminde MMP-9'un akut ve subakut döneme göre azalmakla birlikte halen normalin üzerinde tespit edilmesi MMP-9'un iyileşme döneminde etkili olan bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Nitekim MMP'ların en önemli fonksiyonları olan ekstraselüler matriksin yıkılması

işlevi patolojik prosesler yanı sıra büyüme, yeniden yapılandırma ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik proseslerde de gerekli bir işlemdir (131).

Klasik olarak MMP'lar hücrelerin matrix boyunca ilerlemesini düzenler ve MMP'ların nöronal gelişme sırasında öncü hücrelerin hedef yerlerine ulaşmasında regülatör bir görev üstlendiği sanılmaktadır (132, 133). Miyelogenез prosesi MMP'ların santral sinir sistemindeki diğer bir görev alanıdır. Miyelogenез sırasında oligodendrositler myelin üretmek üzere aksone doğru uzanan ve onu saran uzantılar oluştururlar. Oligodendrositlerin uzantıları büyük ve prosesin devamı beyin matriksinin MMP'lar tarafından yeniden düzenlenmesini gerektirir (134). Bu hipotez araştırılarak oligodendrositlerin miyelogenез sırasında MMP-9 eksprese ettikleri ve MMP inhibisyonunun oligodendrositten dallanmaların uzanmasını engellediği gösterilmiştir. (53). Bunu yanı sıra MMP-2, 3, ve 9 ekspresyonunun askonal faklılaşma ve büyümeyi indükleyen faktörler tarafından artırıldığı bulunmuştur. (135,136).

Wee yong ve arkadaşları MMP'ların santral sinir sistemindeki yararlı etkilerini şu şekilde özetlemişlerdir: 1- Hücre kaderinin belirlenmesi, 2- anjiogenез, 3- myelogenез, 4- aksone büyüme, 5- uyarma, 6- tamir prosesi, 7- nöronal öncülerin son yerleşim yerlerine migrasyonu 8- inflamasyonun sonlanması (53).

MMP'lar ile ilgili olarak patolojik prosesler yanı sıra, MMP'ların santral sisteminde bahsi geçen faydalı etkilerinin de olduğu belirtmek gerekir. Hemen bütün SSS hasarlarından sonra MMP'ların artış tespit edilmesi, MMP'ların iyileşme döneminde fonksiyonları olduğu olasılığını ortaya çıkarmıştır (137). Bilindiği gibi hasar sonrası dokunun tekrar yapılabilmesi için ortamdaki ekstraselüler matriksin bir kısmının parçalanması ve hazır hale getirilmesi gerekir.

Her ne kadar SSS'inin sınırları iyi belirlenmiş parankimal ekstraselüler matriksi olmasa da serebral damarların etrafındaki basal membranda ve tüm tüm SSS'de yaygın olarak amorf ekstraselüler matriks bulunur (138). SSS yaralanmalarında sonra yeni damarların oluşumu iyileşmeyi hızlandırır ve gereklidir. MMP'lar ise anjiogenезde rol oynayarak iyileşmeye katkıda bulunurlar (99). İyileşme döneminde yeni aksone büyüme ve sinaptik alanlarda yeniden birleşmelerin olması ve nöronal uzantılarının ilerlemesi için MMP'lara ihtiyaç vardır (139). Bu nedenle iskemik SVH'ların subakut ve kronik döneminde MMP'ların yüksek olarak bulunması şaşırtıcı değildir.

Çalışmamızda bunu destekler şekilde iskemik inmenin birinci ayında MMP-9 seviyesi akut dönem kadar olmasa da yüksek olarak bulunmuştur.

İnfarakt büyüklüğü ve MMP-9 ilişkisine bakıldığında çalışmamızda akut ve subakut dönemde kaydedilen MMP-9 artışı ile infarkt volümündeki artış arasında anlamlı korelasyon saptandı. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarda elde edilen bulguları desteklemektedir. İskemik inmeli hastalarda yapılan klinik çalışmalarda infarkt volümü ile ilk 48 saat içindeki MMP-9 korelasyonu bildirilmiştir (50, 57). Çalışmamızda bu bulgunun tekrar gösterilmesi yanı sıra infarkt volümü ve MMP-9 arasındaki pozitif korelasyonun ilk haftada devam ettiği gösterilmiştir.

Ancak bu çalışma bize MMP-9 aktivitesinin infarkt volümü ile nedensel bir ilişki olup olmadığını ortaya koymada yeterli değildir. İskemik alanda artan MMP-9'un aşırı aktivitesinin geniş infarkt volümü oluşumuna katkıda mı bulunduğu yoksa iskemik inme alanının genişliği ve ağır nöronal hasarın varlığının yüksek MMP-9 seviyesine neden olduğu konusuna açıklık getirecek kanıtlar sunulmamaktadır. Her iki durum da olası olabilir.

Hayvan deneylerinde elde edilen verilen iskemik alanın MMP ürettiğini göstermektedir. Fukuda S. ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile, maymunlarda iskemi oluşturduktan sonra iskemik beyin dokusundan örnekler alarak, bunları alıcı dokuya aktardıktan sonra proteolitik aktiviteyi araştırmışlar ve ilk kez beyin dokusunun aktif MMP-2, MMP-9 ürettiği ve bunun vasküler matrix yıkımında etkili olduğunu göstermişlerdir (140). Ayrıca bir çok deneysel çalışmada iskemi oluştuktan sonra erken dönemde MMP-9 inhibisyonunun sağlanması ile infarkt volümünde azalma olduğu tespit edilmiştir (103,141, 80, 81). MMP-9 gen mutasyonu yada eksikliği olan farelerde iskemi gelişimi sonrası daha küçük infarkt alanı geliştiği gösterilmiştir (142). Bütün bu sonuçlar MMP-9'un nöronal hasarın bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim serebrovasküler olaylarda biyolojik markırların spesifisite ve sensivitesini araştıran iki çalışmada MMP-9'unda içinde bulunduğu bir teşhis kitinin serebrovasküler hastalıkların erken döneminde tanı için hassas ve spesifik yardımcı biyolojik markırlar olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir (143, 144).

Bu biyolojik markırların iskemik inmedeki önemini belirlemek üzere planlanan bir çalışmada, difüzyon- ve perfüzyon-ağırlıklı MR tekniği kullanılarak tespit edilen kan akımı azalması ve hücrel hasarın boyutu ile iskemik inmenin akut döneminde salınan

sitokinler ve MMP-9 arasındaki korelasyon araştırılmıştır (145). Bu çalışma sonunda, 12. ve 24. saatteki TNF- α ve IL-6 ile bazal perfüzyon-ağırlıklı MR volümü arasında, bazal MMP-9 ile başlangıç (ilk 6 saat içinde) ve son (5-7. günde) difüzyon-ağırlıklı MR volümü arasında korelasyon tespit edilerek, TNF- α ve IL-6 iskemi, MMP-9 ise infarkt volümünün iyi birer göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Korelasyon çalışmaları ile nedensel ilişki kurulması zor olmakla birlikte, bazalde kaydedilen TNF- α ve IL-6 seviyesi ile bazal perfüzyon- difüzyon ağırlıklı MR volümü arasında korelasyon yokken 12. ve 24. saatte bu korelasyonun kurulması, perfüzyon bozukluğunun inflamatuvar sitokinlerin salınmasına; ve benzer şekilde bazal MMP-9 artışının ise infarkt volümü artışına neden olduğu kanısına varılmıştır .

Bizim çalışmamızda infarkt alanın kesin olarak belirlendiği difüzyon ağırlıklı MR tetkiki kullanılmamıştır. Belirlenen volüm iskeminin yerleştiği son infarkt alanıdır ve çalışmamızda kesin infarkt alanı ile akut dönemdeki MMP-9 artışı ile de infarkt volümü arasında korelasyon bulunduğu ve bu korelasyonun subakut dönemde de devam ettiği belirlenmiştir. Subakut dönemde halen infarkt alanı ile MMP-9 artışı arasındaki korelasyonun devam ediyor olması çalışmamızda hiçbir hastanın infarkt volümünü etkileyecek bir tedavi (trombolitik tedavi gibi) almamış olmasından kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda kronik dönemde MMP-9 varlığı ile infarkt volümü arasındaki korelasyon bulunmaması, nöroinflamasyonun kaybolduğu ve iyileşmesinin ve skar oluşumunun geliştiği kronik dönemde, MMP-9'un nöronal hasar dışındaki nedenlere bağlı olarak artış olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda inme prognozu ve MMP-9 seviyesi arasındaki ilişki araştırılmıştır ve birinci hafta, birinci ay ve çalışma sonu ortalama MMP-9 değeri prognozu kötü olan grupta iyi olan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. İskemik inmenin akut döneminde ise MMP-9 değeri ile prognoz arasında ilişki saptanmamıştır. Bu sonuç ile çalışmamızda, iskemik inmeli hastalardaki ilk birinci hafta yüksek kan MMP-9 düzeylerinin kötü prognoz göstergesi olabileceği bulunmuştur. Çalışmamızın iskemik inmede prognozla kan MMP-9 düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışma olması açısından da önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Montaner J. ve arkadaşları, orta serebral arter kardioembolik inme geçiren hastalarda akut dönemde yaptıkları bir çalışmada hastaların ortalama MMP-9 değerleri

ile inme şiddeti arasında anlamlı korelasyon bulmuşlardır. Bu çalışmada ayrıca ilk 48 saat içinde nörolojik iyileşme gösteren hastalarda daha düşük ortalama MMP-9 değeri tespit edilmiştir (85). Bizim çalışmamızda iskemik serebrovasküler olayın her hangi bir dönemdeki ortalama MMP-9 seviyesi ile aynı dönemdeki inme şiddeti arasında ilişki saptanmadı. Bizim çalışmamızda bu korelasyonun bulunmamış olması diğer çalışmaların sonuçları ile çelişki oluşturduğu anlamın gelmemektedir. Çünkü çalışmamızın metodu benzer çalışmalardan farklıdır. Montaner J ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada sadece kardioembolik orta serebral arter infarktı geçiren hastalar çalışmaya alınmıştır. Bizim çalışmamızda ise belli bir serebral arter yada belirli bir tip iskemik serebrovasküler hastalık seçilmemiş, akut iskemik serebrovasküler geçiren tüm hastalar çalışmaya alınmıştır. Hastalar içinde daha küçük infarkt volümü ile daha ağır nörolojik defisite neden olabilen posterior sirkülasyona ait infarkt geçirmiş hastalarda bulunuyordu. Ayrıca geçici iskemik atak geçiren hastalar çalışmaya alınmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda MMP-9 ile inme şiddeti ile zamansal olarak bir ilişki olmaması doğaldır.

Çalışmamızda eş zamanlı inme şiddeti ile MMP-9 seviyesi arasında korelasyon bulunmamasının, bu korelasyonu doğrulayan diğer çalışmaların sonuçlarını etkilemeyeceği inancındayız. Montaner J. ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuç ile benzer olarak bizim çalışmamızda da nörolojik durumdaki değişiklik ile hastaların çalışma sonu MMP-9 değerleri arasında anlamlı ilişki saptandı. Bu ilişki birinci ay sonunda inmenin ilk gününe göre nörolojik durumunda kötüleşme olan hastaların ortalama MMP-9 seviyesinin nörolojik durumunda değişme olmayan ve iyileşme olan hastalara göre daha fazla bulunması ile gösterilmiştir. Bu sonuç ise kötü prognozu olan hastaların daha yüksek MMP-9 seviyesine sahip oldukları sonucunu destekler bir bulgudur.

Çalışmamızda iskemik inme risk faktörlerinin varlığının MMP-9 artışı ile ilişkisine de bakıldı ve iskeminin her hangi bir döneminde MMP-9 seviyesi, öz geçmişinde hipertansiyon, koroner arter hastalığı, geçirilmiş inme öyküsü, sigara alışkanlığı olan hastalarda olmayanlara göre farklı bulunmadı. Fakat diyabetik hasların 1. hafta MMP-9 değerleri diyabetik olmayanlara göre yüksek bulundu. Ayrıca iskemik olayın ilk gününde tespit edilen kan şekeri değeri nörolojik durumunda kötüleşme olan ve prognozu kötü olan hastalarda kötü bulundu. Benzer şekilde Montaner J ve

arkadaşları akut orta serebral arter infarktı geçiren hastalarda yaptıkları çalışmada MMP-9 artışı ile kan şekeri yüksekliği arasında korelasyon bulmuşlardır. Kan şekeri yüksekliğinin MMP-9 ile ilişkisi son yıllarda dikkati çekmektedir. Uemura ve arkadaşları diyabet oluşturulan farelerin vasküler dokularında ve serumlarında artmış MMP-9 aktivitesinin arttırdığını saptamışlar ve MMP-9 aktivitesinin diyabete bağlı vasküler komplikasyonlarda etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (146). Massengale JL ve arkadaşları ise farelerde hipergliseminin astrositlerde MMP-9 üretimini artırdığını göstermişlerdir (147).

İskemik SVH'lar, ölüme neden olmaları dışında aynı zamanda önemli morbidite nedenidirler. Bir çok epidemiyolojik çalışma SVH'lar sonucu gelişen sakatlığın neden olduğu dezavantajlar üzerine eğilmektedir. SVH insidansını azaltmaya yönelik çalışmalarda primer korunma yöntemlerindeki iyileştirmeler büyük önem gösterse de, SVH gerçekleşikten sonra uygulanabilecek etkili tedavilerin geliştirilmesi de o derecede önemlidir. SVH geçiren hastaların hastane şartlarında geçirdikleri akut dönem ve tedaviler SVH yaklaşımın en pahalı kısmını oluşturmaktadır. Gelecekte SVH geçiren hastaların tıbbi bakımları uzun dönemden daha çok akut dönemde yoğunlaşacaktır (3). Bu nedenle yeni tedavi stratejileri belirlemede, serebral iskemi patogenezinde etkili olan mekanizmaların bilinmesi önem taşımaktadır.

Daha önce yapılan bir çok çalışma ve bizim çalışmamızın sonuçları göstermiştir ki; MMP'lar beyin dokusunda, iskemi ve inflamasyon sırasında doku hasarına neden olma, beyinde oluşan hasardan sonra iyileşme ve gelişme mekanizmalarında çeşitli rolleri ve etkileri vardır. MMP'ların aktivasyon prosesleri başlangıçta diğer proteazlar, proinflamatuvar sitokinler tarafından yönetilmektedir. Mikroglia ve doku makrofajları, hem MMP'ların salınmasını sağlayarak hem de MMP'ların aktive eden maddeleri oluşturarak inflamatuvar yanıtta kritik rol oynamaktadırlar.

İskemi olmaksızın oluşan nöroinflamasyon serebral damarlara ve dokuya geçici hasar verir ve bu hasar steroid gibi antiinflamatuvar ajanlar ile geri döndürülebilir (148). İskemik hasar ise nöron ölümüne yol açan mekanizmaları indükleyen hipoksi ile komplike olmuştur. Bu durum iskemik SVH'lara bağlı hasarı mücadele edilmesi çok daha zor hale getirmektedir.

Bu nedenle iskemik inmede tedavinin amacı nöronal hasar ile sonuçlanan olaylar zincirinin en başında durdurulmasının gerekliliğini konusunda yoğunlaşmıştır. İskemik

nöronal hasarda en baştan beri etkili olduğu gösterilen MMP'ların üretimine yol açan faktörleri erken dönemde bloke etmenin faydalı olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla bir çok çalışma yapılmıştır.

MMP'ların sentetik inhibitörleri klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (149, 150). MMP doku inhibitörleri (TIMP) hidroksimat yapısındadır ve bu yapı MMP'ların katalitik bölümünde bulunan Zn^{+2} ile etkileşerek aktivitesine engel olur (151, 152). Santral sinir sistemi hastalıklarının hayvan modellerinde MMP inhibitörleri ile ilgili olarak cesaret verici sonuçlar alınmıştır (79, 80, 153, , 154). Farelerde yapılan çalışmalar ile MMP inhibitörleri ve MMP nötralize edici antikor tedavisi ile vazojenik ödem oluşumunda ve infarkt volümünde azalma sağlanmıştır (78, 79). Yine farelerde MMP-2'nin indüklediği kan beyin bariyerinin açılması TIMP-2 ile bloke edilebilmiştir (155). Bu ve benzeri sonuçlar SVH'ların tedavisinde bir seçenek olarak ümit verici olsa da halen bir çok sorun vardır.

MMP'ların seçici inhibitörlerinin üretimi oldukça zordur ve yapıları MMP'ların yapısında oldukça benzemektedir. Ayrıca bu moleküller MMP'ların yararlı etkileri ile de etkileşirler. MMP'ların beyin dokusundaki yararlı yada zararlı bir çok etkisi düşünüldüğünde bu tedavi yöntemlerini çalışmak zaman kaybı olabilir (72). TIMP'lar ile ilgili diğer bir çekince yan etkileridir. Bu ajanların kanser tedavisinde kronik kullanımları muhtemelen MMP'lerin önemli bir fonksiyonu olan yeniden yapılandırmayı inhibe ederek fibrozis ve eklem problemleri ile sonuçlanmıştır (72). Akut serebral iskemide uzun dönem kullanımları sınırlandırılarak bu problemin aşılabileceği düşünülse de TIMP tedavisi ile ilgili sorunun asıl çözümü spesifik inhibitörler üzerinde yapılacak çalışmalar sonunda ortaya çıkacaktır.

Rekombinant doku plasminojen aktivatorü (rtPA), plasminojenin plasmine dönüşümünü aktivederek fibrin ve fibrinojen yıkımını sağlar. İntravenöz rtPA iskemik SVH'larda şikayetlerin başlangıcından ilk 3 saat içinde uygulandığında yararlı olan bir tedavi yöntemidir (156, 157). Fakat trombolitik tedavi ile semptomatik kanama riski artmaktadır. İskemik SVH'larda trombolitik tedavinin daha güvenle kullanılabilmesi için rtPA'nın etkileri hakkında daha ileri bilgilere ihtiyaç vardır.

Fibrinolitik aktivite yanı sıra, plasminojen-plasmin sisteminin ekstraselüler matriks komponentlerinin parçalanmasında (158) ve MMP'ların aktivasyonunda da rolleri vardır (159,160). Bu nedenle, rtPA, fokal serebral iskemide ve reperfüzyonda

görülen gözlenen mikrovasküler bütünlüğün bozulmasını artırabilirler (161). rtPA'nın zararlı etkilerinden biri de iskemik SVH'da inflamasyonu yöneten endotelial fonksiyonlarda değişiklik yapmasıdır (162,163). Fokal serebral iskemiden sonra meydana gelen kanamaların primer nedeni endotelial basal lamina yapısının bozulmasıdır (164). Plasmin tarafından aktive olabilen MMP-9 ayrıca endotelial basal laminayı da parçalayabilir (165, 166). Havyan çalışmalarında hemorajik dönüşümün görüldüğü iskemik infarktlarda MMP-9 aktivitesinde önemli oranda artma gösterilmiş ve MMP-9'un basal lamina yapısını bozarak hemorajik dönüşüm ve serebral ödeme katkıda bulunduğu kanıtları bulunmuştur (78,167).

Benzer bir çok çalışmanın sonucunda MMP inhibitörlerinin rtPA'ya bağlı hemorajilerin azaltılmasında etkili olup olamayacağı sorusu gündeme gelmiştir. Farelerde oluşturulan iskemik SVH modellerinde rtPA sonrası MMP inhibitörlerinin uygulanması ile trombolitik tedaviye bağlı kanama şiddeti ve insidansı önemli oranda azaltılabilmektedir (68, 168). Bu sonuçlar, iskemik SVH'lı hastalarda yüksek MMP-9 ekspresyonu trombolitik tedavi sonucu kanama komplikasyonundaki artış ile ilişkilendirmektedir.

Bu çalışmada, akut, subakut, kronik dönemde iskemik SVH'larda MMP-9 aktivitesi saptanarak, MMP-9 aktivitesinin iskemik serebrovasküler hastalıklarda infarkt alanı büyüklüğü, nörolojik durumdaki kötüleşme ve kötü prognoz açısından önemi gösterilmiştir. İskemik serebrovasküler olayın akut döneminde MMP-9'un etkisi artık iyi bilinmektedir ve bu etki subakut dönemde de devam etmektedir ve kötü prognoza işaret etmektedir. Kronik dönemde ise MMP-9 iskemik inmede halen etkili yüzeyde yüksek kalmaktadır. MMP'ların beyinin mikro-ortamına yararlı ve zararlı etkileri olduğu dikkate alınarak MMP inhibitörlerinin tedavide kullanımı buna göre belirlenmelidir. Sonuçlarımız akut ve subakut dönemde MMP-9 aktivitesinin inhibisyonun prognozda etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların iskemik SVH tedavisinde güncel yaklaşımlara ışık tutacağı ve yeni tedavi yöntemleri gelişimine ve uygun şekilde kullanımına katkıda bulunacağını umuyoruz.

SONUÇLAR

- 1- Çalışmaya 35'i kadın, 24'ü erkek olmak üzere 59 iskemik inmeli hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 63'dü. Kontrol grubu olarak 19'u kadın, 16'ı erkek toplam 35 kişi alındı. Kontrol grubunun yaş ortalaması 58'di. Kontrol grubu ile hasta grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu .
- 2- Hasta grubunun ortalama MMP-9 değerleri kontrol grubunun MMP-9 değerlerine göre oldukça anlamlı derecede artmıştı.
- 3- Hasta grubunun SVH dönemlerine göre MMP-9 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Birinci hafta sonunda ortalama MMP-9 değerinde birinci gündekine göre artmış olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, birinci ay MMP-9 değerinde, birinci gün ve birinci hafta MMP-9 değerlerine göre azalma istatistiksel olarak anlamlıydı.
- 4- Hastalar cinsiyet, vasküler risk faktörlerine (DM, HT, KAH, inme öyküsü, sigara alışkanlığı) göre gruplandırılıp MMP-9 ortalama değerleri karşılaştırıldığında birinci hafta MMP-9 değerinin diyabetik olan hastalarda diyabetik olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olması dışında istatistiksel farklılık bulunmadı.
- 5- Hastalık NIHSS skorları ile MMP-9 değerleri arasında korelasyon analizleri sonucu çalışmaya katılan tüm hastaların son MMP-9 değerleri ile son NIHSS skorları arasında pozitif korelasyon bulundu. Bu korelasyon birinci günde yani akut dönemde kaydedilen NIHSS skorları ve MMP-9 değerleri arasında bulunamadı.
- 6- Çalışmanın sonunda nörolojik defisiti hafif olan hastaların (NIHSS <8) çalışma sonundaki ortalama MMP-9 değerleri nörolojik defisiti ağır olanlara göre (NIHSS ≥8) daha az ve geliş kan şekeri seviyesi daha düşük bulundu.
- 7- Çalışma sonunda nöroloji durumunda iyileşme olan hastaların akut dönemde kaydedilen ortalama MMP-9 değerleri nörolojik durumunda iyileşme göstermeyen gruba göre farklı değilken bu hastaların ortalama son MMP-9 değerleri daha düşüktü. Ayrıca nörolojik durumunda iyileşme olan hastaların

- geliş kan şekeri seviyesi de iyileşme göstermeyen gruba göre anlamlı oranda düşüktü.
- 8- Hastalar prognozları açısından değerlendirildiğinde prognozu kötü olan hastaların birinci hafta MMP-9 değerleri prognozu iyi olanlara göre anlamlı oranda yüksek bulundu. Ayrıca prognozu kötü olan hastaların geliş kan şekeri seviyesi yüksek ve infarkt volümleri ise daha fazla bulundu.
 - 9- Hastaların MRS puanları ile sonundaki son MMP-9 değerleri, birinci hafta ve birinci ay MMP-9 değerleri ile arasına pozitif korelasyon saptandı. Fakat birinci gün MMP-9 değerleri ile MRS puanları arasında bir korelasyon bulunmadı.
 - 10- Çalışma süresince ilk hafta içinde 15 hasta, 2-4. hafta içinde 7 hasta olmak üzere toplam 22 hasta öldü. Çalışma sonunda hayatta kalan ve ölen hastaların verileri karşılaştırıldığında, ölen hastaların geliş kan şekeri ve infarkt volümünün yaşayanlara göre daha yüksek olması dışında fark saptanmadı.
 - 11- SVH risk faktörlerine göre hastalar risk faktörü olan ve olmayan şeklinde gruplara ayrıldı ve bu grupların MMP-9 değerleri arasında inme şiddeti ve prognoz açısından fark saptanmadı.
 - 12- Çalışmamızda tüm hastaların ortalama infarkt volümü $92.83 \pm 74.7 \text{ cm}^3$ olarak bulundu. Birinci gün ve birinci hafta MMP-9 değerleri ile infarkt volümü arasında pozitif korelasyon bulunurken, birinci ay MMP-9 değerleri ile infarkt volümü arasında korelasyon bulunmadı.
 - 13- Hastaların ilk 24 saat içinde çekilen BBT görüntülemelerinde erken infarkt bulguları olanların olmayanlara göre MMP-9 değerleri fazla olmakla birlikte bu fark her üç dönemde de istatistiksel olarak anlamlı değildi.

ÖZET

İSKEMİK SEREBROVASKÜLER HASTALIKLARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 AKTİVİTESİNİN BİR RİSK VE PROGNOSTİK FAKTÖR OLARAK ÖNEMİ

GİRİŞ ve AMAÇ

Matrix metaloproteinazlar, extraselüler matriks proteinlerini parçalayan bir endopeptidaz ailesidir. MMP-9 (geletinaz-B), spesifik olarak serebral kan damarlarının etrafında bulunan basal laminanın ana komponentlerinden olan tip IV kollojeni, laminini ve fibrinotikini parçalamaktadır. Normal erişkin santral sinir sisteminde MMP-9 yok yada düşük seviyelerde bulunurken, bir çok nörolojik hastalıkta yükseldiği tespit edilmiştir. Hayvan modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda ve serebrovasküler hastalık geçirmiş hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, MMP-9'un iskemik olaydan sonra erken dönemde arttığı gösterilmiştir. Fakat MMP-9'un iskemik SVH'larda klinik önemi, patogeneze katkısı ve prognoza etkisi net değildir. Bu çalışmada, iskemik SVH geçiren hastaların akut, subakut, kronik dönemde MMP-9 aktivitesi saptanarak, hastalık şiddeti ve prognozu üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Ocak 2003 ve Ağustos 2004 tarihleri arasında, Üniversitemiz Nöroloji kliniğine, fokal nörolojik defisit ile başvuran ve akut iskemik inme tanısı konan 59 hasta çalışmaya alınarak prospektif olarak araştırıldı. Hastaların nörolojik muayeneleri kliniğe kabul edildikleri ilk günde ve takiplerinin birinci haftası ve birinci ayında yapıldı. Nörolojik muayene ile eş zamanlı olarak serum MMP-9 seviyelerini belirlenmek üzere kan örnekleri alındı. İnme şiddetini belirlemek üzere National Institutes of Health Stroke Scale – NIHSS kullanıldı. İnme prognozu ise Modified Rankin Scale – MRS kullanılarak belirlendi. Hastaların demografik özellikleri, öz geçmişlerinde var olan vasküler risk faktörleri (diyabetes mellitus, hipertansiyon, sigara kullanımı, kan yağları yüksekliği, geçirilmiş inme öyküleri), geliş sistolik ve diastolik kan basıncı değerleri, kan biyokimyasal değerleri (tam kan sayımı, sedimantasyon, C-reaktif protein, kan

şekeri, böbrek fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri, total protein, serum albumin, kan şekeri düzeyleri, kan lipid profilleri) detaylı olarak kaydedildi. Tüm hastaların elektrokardiyografi, ECHO kardiografi ve karotid, vertebral arter doppler ultrasonografi tetkikleri yapıldı. İnfakt volümünü belirlemek üzere SVH'lığın 3.gününden sonra kranial görüntülemesi yapıldı.

SONUÇLAR

İskemik inme hastalarında birinci gün, birinci hafta ve birinci ay MMP-9 seviyeleri kontrol grubuna göre oldukça anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.000$). Üç dönem MMP-9 değeri karşılaştırıldığında birinci ay MMP-9 değeri birinci.gün ve birinci haftaya göre anlamlı olarak azalmış olarak tespit edildi (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.001$). Her üç dönemde MMP-9 değeri ile aynı dönemdeki NIHSS arasında korelasyon bulunmadı. Çalışma sonundaki inme şiddeti ile birinci gün MMP-9 arasında anlamlı ilişki bulunmazken, son MMP-9 değeri inme şiddeti ağır olan hastalarda hafif olanlara göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p=0.037$). Çalışma sonunda prognozu kötü olan hastalar ($MRS>2$)'ın birinci hafta MMP-9 değeri iyi olanlara ($MRS\leq 2$) göre anlamlı derece yüksekti ($p=0.021$). Birinci gün ve birinci ayda ise bu farklılık saptanmadı. Hastaların infarkt hacimleri ile her üç dönemde MMP-9 değerleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, birinci gün ve birinci hafta MMP-9 değerleri ile infarkt volümü arasında anlamlı oranda pozitif korelasyon varken birinci ayda bu korelasyon bulunamadı (sırası ile $p=0.008$, $p=0.004$, $p=0.162$).

TARTIŞMA

İskemik SVH'ta erken dönemde MMP-9 aktivitesi artmakta ve bu birinci haftada maksimum düzeye ulaşmaktadır. MMP-9 seviyesi kronik dönemde azalmakla birlikte normal bireylere göre yüksek seviyelerde kalmaya devam etmektedir. MMP-9 aktivitesi aynı dönemdeki inme şiddeti ile korele olmamakla birlikte birinci haftada MMP-9 aktivitesi yüksek olan hastaların prognozları daha kötü olmaktadır. İskemik inmenin akut ve subakut dönemindeki artmış MMP-9 aktivitesi infarktın büyüklüğü ile doğrudan ilişkili olup, nöronal hasar ve beyin dokusu harabiyetinin şiddeti ilgilidir. Gelecekte MMP-9 aktivitesini inhibe etmeye yönelik tedavilerin geliştirilmesinin, iskemik inmede, nöronal hasarı azaltmada ve prognozda etkili olacağına inanılmaktadır.

SUMMARY

THE MATRIX METALLOPROTEINASE-9 ACTIVITY IN AS A RISK AND PROGNOSTIC FACTOR IN ISCHEMIC CEREBROVASCULAR DISEASE

INTRODUCTION

Matrix metalloproteinases are endopeptidases family which degrades the extracellular matrix proteins. MMP-9 (gelatinase-B), specifically destroy collagen type IV, laminin and fibronectin which are main components of the basal lamina located around the cerebral blood vessels. In normal central nervous system, MMP-9 is either not available or in low levels, however it has been found that this level rises during many neurological cases. In the experimental studies in which animal models were used and clinical studies on the patient who had suffered from cerebrovascular disease (CVD), it is indicated that MMP-9 increases in the early period after the ischemic event. But the clinical importance of MMP-9 in the ischemic CVD, its contribution to pathogenesis and prognosis are not clear. In this study, the effect of MMP-9 on the severity and prognosis of ischemic CVD has been searched by means of identifying MMP-9 activity in acute, subacute and chronic period.

SUBJECTS and METHODS

Fifty nine patients who applied to our university neurology clinic between January 2003 and August 2004 with focal neurological deficit and were diagnosed to have acute ischemic CVD have been included the study and searched prospectively. The neurological examinations of the patients were made in the first day in which they were admitted to the clinic, and first week and a month of the control applied to them. Simultaneously with the examinations, the small amounts of the blood were taken in order to determine the serum MMP-9 activity. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) was used to determine the severity of stroke. The prognosis of stroke was determined by performing Modified Rankin Scale (MRS). The demographic features of the patients, the vascular risk factors in past history (diabetes mellitus, hypertension, smoking, high levels of blood cholesterol and triglyceride, previous CVD history), systolic and diastolic pressure, biochemical studies (complete blood count,

sedimentation, C-reactive protein, glucose, kidney and liver function test, HDL, LDL, triglyceride, cholesterol) were performed comprehensively. The electrocardiography, ECHO cardiography and carotid/vertebral artery Doppler ultrasonography were also made for etiological diagnosis.

RESULTS

MMP-9 levels of the patients suffering from ischemic CVD in the first day, week and month were found statically higher than the MMP-9 of control subjects ($p=0.000$). Once the MMP-9 values of these three periods were compared, the MMP-9 value of the first month was determined as meaningfully low compared to the values of the first day and week ($p=0.000$, $p=0.001$ respectively). A correlation between the MMP-9 of three periods and NIHSS in the same periods could not be found. While there was no difference between MMP-9 at the beginning of the study and the severity of stroke at the end of the study, the final MMP-9 activity was found higher in the patients with severely deficit as compared to the ones having mild deficit ($p=0.037$). At the end of the study, the MMP-9 of the first week in the patient with bad prognosis was higher than the ones having good prognosis ($p=0.021$). But this difference could not be found in the first day and month. When the relationship between the infarct volume and MMP-9 was assessed, the positive correlation found between infarct volume and MMP-9 values of the first day and week, which was not valid for the first month ($p=0.008$, $p=0.004$, $p=0.162$ respectively).

DISCUSSION

The MMP-9 activity in the ischemic CVD increases in the early period and reaches to maximum level in the first week. Although the level of MMP-9 decreases in the chronic period, it continues to be in high levels as compared to normal individuals. Although the MMP-9 activity is not correlated to the severity of stroke in the same period, the prognosis of the patients whose MMP-9 activities are high in the first week become worse. The increased MMP-9 activity of ischemic CVD in the acute and subacute periods is directly positively correlated to the volume of infarct and has relationship with neuronal damage, destroyed brain tissues. It is believed that the development of the treatments targeted to inhibit the activity of MMP-9 will be effective in ischemic CVD by decreasing the neuronal damage and preventing worse prognosis in the future.

KAYNAKLAR:

- 1 - Raymond D. Adams, Maurice Victor, Allan H. Ropper. Principles of Neurology, 6th edition, pp 777-810.
- 2 - Sudlow CL, Warlow CP. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration. Stroke. 1997 Mar;28(3):491-9.
- 3 - Warlow CP. Epidemiology of stroke. Lancet. 1998 Oct;352 Suppl 3:SIII1-4.
- 4 - Hankey GJ. Stroke: how large a public health problem, and how can the neurologist help? Arch Neurol. 1999 Jun;56(6):748-54.
- 5 - Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world. Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997: 349. 1269-1276.
- 6 - Bonita R. Lancet. Epidemiology of stroke. 1992 Feb 8;339(8789):342-4.
- 7 - Murray CJL, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997: 349. 1269-1276.
- 8 - Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O, Neundoerfer B, Heuschmann PU. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. Stroke. 2001 Dec 1;32(12):2735-40.
- 9 - Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. Stroke. 1999 Dec;30(12):2513-6.
- 10 - Murat Sumer M, Erturk O. Ischemic stroke subtypes: risk factors, functional outcome and recurrence. Neurol Sci. 2002 Mar;22(6):449-54.
- 11 - Grau AJ, Weimar C, Bugge F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. Stroke. 2001 Nov;32(11):2559-66.
- 12 - Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. Lancet. 1991 Jun 22;337(8756):1521-6.
- 13 - Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a

-
- multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993 Jan;24(1):35-41.
- 14 - Goldstein M, Barnett HJM, Orgogozo JM, Sartorius N, Symon L, Vereshchagin NV: Stroke-1989: Recommendation of stroke prevention diagnosis and therapy. Report of WHO Task Force on Stroke and Other Cerebrovascular Disorders. *Stroke* 1989;20:1407-1431
- 15 - Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*. 1994 Nov;22(4):991-6.
- 16 - Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22; 391-397.
- 17 - Nehls DG, Park CK, MacCormack AG, McCulloch J. The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade with MK-801 upon the relationship between cerebral blood flow and glucose utilisation. *Brain Res*. 1990 Mar 19;511(2):271-9.
- 18 - Walter G. Bradly, Robert B. Daroff, Gerald M. Fenichel, Joseph Jankovic. *Neurology in Clinical Practice*, 4th edition, pp 1201.
- 19 - Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1997 Nov 1;17(21):8178-86.
- 20 - Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*. 1997 Dec 26;91(7):917-25.
- 21 - Jian Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2005 Jul 1;39(1):71-80. Epub 2005 Apr 14.
- 22 - Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* (2001). 21:2-14.
- 23 - Dugan LL, Choi DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol*. 1994;35 Suppl:S17-21.
- 24 - Philips JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiology* 1994; 42: 441-448.
- 25 - Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1991 Oct;71(4):1185-95.

-
- 26 - Emre Kumral. Akut iskmik İnme. Sayfa:59-63.
- 27 - Huang CY, Fujimura M, Chang YY, Chan PH. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 2001 Mar;32(3):741-7.
- 28 - Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996 Jun;27(6):1124-9.
- 29 - Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci*. 1998 Jan 1;18(1):205-13.
- 30 - Bond A, O'Neill MJ, Hicks CA, Monn JA, Lodge D. Neuroprotective effects of a systemically active group II metabotropic glutamate receptor agonist LY354740 in a gerbil model of global ischaemia. *Neuroreport*. 1998 Apr 20;9(6):1191-3.
- 31 - O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997 Jun;20(6):252-8.
- 32 - Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*. 2003 Jan;34(1):214-23.
- 33 - Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Oct 15;825:179-93.
- 34 - Wang GJ, Deng HY, Maier CM, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience*. 2002;114(4):1081-90.
- 35 - Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):209-16.
- 36 - Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke*. 2002 Feb;33(2):586-92.

-
- 37 - Del Zoppo GJ, Becker KJ, Hallenbeck JM. Inflammation after stroke: is it harmful? *Arch Neurol.* 2001 Apr;58(4):669-72.
- 38 - Del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke.* 1991 Oct;22(10):1276-83.
- 39 - Hess DC, Zhao W, Carroll J, McEachin M, Buchanan K. Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. *Stroke.* 1994 Jul;25(7):1463-7
- 40 - Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol (Berl).* 1999 Mar;97(3):215-20
- 41 - Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1993 Dec;24(12):2002-8.
- 42 - MacManus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Aug;17(8):815-32.
- 43 - Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* (2001). 21:99–109.
- 44 - Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cul J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*(2002) 297:1186–1190.
- 45 - Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* (1998). 152:729–741.
- 46 - Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res.* 1998 Mar 15;239(2):183-201.
- 47 - Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 1998 Jul 1;46(4):281-309.
- 48 - Smrcka M, Horky M, Otevrel F, Kuchtickova S, Kotala V, Muzik J. The onset of apoptosis of neurons induced by ischemia-reperfusion injury is delayed by transient period of hypertension in rats. *Physiol Res.* 2003;52(1):117-22.

-
- 49 - Risau, W., and H. Wolburg. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13: 174–178, 1990.
- 50 - Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 1994 Aug;25(8):1658-64
- 51 - Romanic AM, Madri JA. 1994. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol* 4:145–156.
- 52 - Hideaki Nagase and J. Frederick Woessner. Matrix Metalloproteinases. *J Biological Chemistry*, Vol.274,No.31, Issue of July 30, PP.21491-21494.
- 53 - Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jul;2(7):502-11.
- 54 - Robet Visse, Hideaki Nagase. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.*2003;92:827-839.
- 55 - Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in the nervous system: the good, the bad and the enigmatic. Meeting report. *TINS* Vol.22, No.7, 1999.
- 56 - Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2004 Jan 1;75(1):1-11.
- 57 - Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke.* 2000 Jan;31(1):40-7.
- 58 - Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94: 2493–2503.
- 59 - Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation.* 1995;91:2125–2131.
- 60 - Ruoslahti E. Glycobiology. Brain extracellular matrix. 1996 Jul;6(5):489-92.
- 61 - Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997 Oct;23(5):406-15.
- 62 - Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.* 2002 Sep;39(3):279-91. Review. Erratum in: *Glia* 2002 Oct;40(1):130.

-
- 63 - Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett.* 1995 Dec 15;201(3):223-6.
- 64 - Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. 1998. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020–1030.
- 65 - Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN, McCutcheon IE, Stetler-Stevenson WG, Nicolson GL, Rao JS. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 1996 Jan;14(1):35-42.
- 66 - Rosenberg, G. A., Navratil, M., Barone, F. & Feuerstein, G. Z. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 360–366 (1996).
- 67 - Conant, K. et al. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. *Ann. Neurol.* 46, 391–398 (1999).
- 68 - Selkoe, D. J. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 447–453 (1998).
- 69 - Kieseier, B. C. et al. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 124, 341–351 (2001).
- 70 - *J Neuroimmunol.* 2005 Feb;159(1-2):146-54. Epub 2004 Nov 4. The pro and the active form of matrix metalloproteinase-9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Demestre M, Parkin-Smith G, Petzold A, Pullen AH.
- 71 - Perry VH, Andersson PB. 1992. The inflammatory response in the CNS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18:454–459.
- 72 - Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. 1991. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28:236–243.
- 73 - Rosenberg GA. 1995. Matrix metalloproteinase's in brain injury. *J Neurotrauma* 12:833–842.
- 74 - Mun-Bryce S, Rosenberg GA. 1998a. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274:R1203–11.

-
- 75 - Mun-Bryce S, Lukes A, Wallace J, Lukes-Marx M, Rosenberg GA. Stromelysin-1 and gelatinase A are upregulated before TNF- α in LPS-stimulated neuroinflammation. *Brain Res* 200. 2933:42–49.
- 76 - Mun-Bryce S, Rosenberg GA. 1998b. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1163–1172.
- 77 - Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. 1996b. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360–366
- 78 - Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*. 1997;238:53–56.
- 79 - Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:624–633
- 80 - Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29:2189–2195.
- 81 - Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. 2000. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1681–1689.
- 82 - Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 21:7724–7732.
- 83 - Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. 1999. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1020–1028.
- 84 - Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. 1995. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26:2120–2126.
- 85 - Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas

-
- J, Gonzalez MA, Monasterio J. 2001a. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 32:1759–1766.
- 86 - Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. 2001b. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 32:2762–2767.
- 87 - Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. 1985. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol (Berl)* 68:122–129.
- 88 - Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005 Jun;50(4):329-39.
- 89 - Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
- 90 - Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett*. 2004 Jun 1;567(1):129-35.
- 91 - Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma* (1995). 12:833–842.
- 92 - Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998). Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274: R1203–1211.
- 93 - Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 May;16(3):360-6.
- 94 - E.H. Lo, T. Dalkara, M.A. Moskowitz, Mechanisms, challenges and opportunities in stroke, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 399–415.
- 95 - Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P, Zilles K. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience*. 1998 Jan;82(2):397-420.
- 96 - Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991 May;5(8):2145-54.

-
- 97 - Hamann GF, Liebetrau M, Martens H, et al. Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:526–533.
- 98 - Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischaemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.*
- 99 - Muellner A, Benz M, Kloss CU, Mautes A, Burggraf D, Hamann GF. Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2003 Aug;20(8):745-54.
- 100 - Hamann GF, Schrock H, Burggraf D, Wunderlich N, Liebetrau M, Kuschinsky W. Microvascular Basal lamina damage after embolic stroke in the rat: relationship to cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Nov;23(11):1293-7.
- 101 - Vosko MR, Busch E, Burggraf D, Bultemeier G, Hamann GF. Microvascular basal lamina damage in thromboembolic stroke in a rat model. *Neurosci Lett.* 2003 Dec 26;353(3):217-20.
- 102 - Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* 2003 Sep;34(9):2165-70. Epub 2003 Aug 7.
- 103 - Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998a). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1163-1172
- 104 - Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999;842:92–100.
- 105 - Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. 1997. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 406–415.
- 106 - Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke.* 1998 May;29(5):1020-30.
- 107 - Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus

-
- embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2002 Nov;33(11):2711-7.
- 108 - Liu WH, Chen XM, Fu B. Thrombin stimulates MMP-9 mRNA expression through AP-1 pathway in human mesangial cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2000 Jul;21(7):641-5.
- 109 - Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13066-76.
- 110 - Yu Q, Stamenkovic I. Localization of metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999;13:35-48.
- 111 - Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Aug;32(2):368-72.
- 112 - Gottschall PE, Yu X. Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*. 1995 Apr;64(4):1513-20.
- 113 - Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatsky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci*. 2002 Jan;15(1):19-32.
- 114 - Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res*. 2001 Mar 2;893(1-2):104-12.
- 115 - Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem*. 1986 Feb 25;261(6):2814-8.
- 116 - Lee SR, Lo EH. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Jul;24(7):720-7.

-
- 117 - Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989 Feb 9;320(6):365-76.
- 118 - Justicia C, Panes J *Med.* 1989 Feb 9;320(6):365-76. Review, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Dec;23(12):1430-40.
- 119 - Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol.* 1986;35:3189–3197.
- 120 - Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994;144:188–199.
- 121 - Kjeldsen L, Bjerrum OW, Hovgaard D, Johnsen AH, Sehested M, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase: a marker for circulating blood neutrophils: purification and quantification by enzyme linked immunosorbent assay. *Eur J Haematol.* 1992;49:180–191.
- 122 - Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 2000 Oct;31(10):2325-9.
- 123 - Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, Davalos A. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke.* 2002 Apr;33(4):982-7.
- 124 - DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology.* 1998 Sep;51(3 Suppl 3):S62-8.
- 125 - Hallenbeck JM. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol.* 1996;71:281-97; discussion 297-300.
- 126 - Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke.* 1992 Sep;23(9):1367-79.
- 127 - Gottschall PE, Yu X. Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* 1995 Apr;64(4):1513-20.

-
- 128 - Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamei K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption.
- 129 - Castillo J, Rodriguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17 Suppl 1:7-18.
- 130 - Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J. A. Engler. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 197–250, 1993.
- 131 - Chernoff, E. A. G., O'Hara, C. M., Bauerle, D. & Bowling, M. Matrix metalloproteinase production in regenerating axolotl spinal cord. *Wound Repair Regen.* 8, 282–291 (2000).
- 132 - Del Bigio, M. R. & Jacque, C. M. Localization of proteinase expression in the developing rabbit brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86, 345–347 (1995).
- 133 - Frolichsthal-Schoeller, P. et al. Expression and modulation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *Neuroreport* 10, 345–351 (1999). metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *Neuroreport* 10, 345–351 (1999).
- 134 - Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW. Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia.* 1998 Jan;22(1):53-63.
- 135 - Machida, C. M., Rodland, K. D., Matrisian, L., Magun, B. E. & Ciment, G. NGF induction of the gene encoding the protease transin accompanies neuronal differentiation in PC12 cells. *Neuron* 2, 1587–1596 (1989).
- 136 - Chambaut-Guerin, A. M., Herigault, S., Rouet-Benzineb, P., Roucher, C. & Lafuma, C. Induction of matrix metalloproteinase MMP-9 (92-kDa gelatinase) by retinoic acid in human neuroblastoma SKNBE cells: relevance to neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 74, 506–517 (2000).
- 137 - Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS Voon Wee Yong, Craig A. Krekoski, Peter A. Forsyth, Robert Bell and Dylan R. Edwards *Trends Neurosci.* (1998) 21, 75–80

-
- 138 - Bertolotto A, Rocca G, Schiffer D. Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. *J Neurol Sci.* 1990 Dec;100(1-2):113-23.
- 139 - Nordstrom LA, Lochner J, Yeung W, Ciment G. The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae. *Mol Cell Neurosci.* 1995 Feb;6(1):56-68.
- 140 - Fukuda sS, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.* 2004 Apr;35(4):998-1004. Epub 2004 Mar 4.
- 141 - Jiang X, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R77785R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 2001 Jun 1;305(1):41-4.
- 142 - Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphologicalthe proteolysis of blood-brain barrier and motor outcomeswhite matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7724-32.
- 143 - Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke.* 2004 Jan;35(1):57-63. Epub 2003 Dec 11.
- 144 - Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK, Laskowitz DT, Valkirs GE, Buechler KF. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem.* 2003 Oct;49(10):1733-9.
- 145 - Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribo M, Chacon P, Monasterio J, Alvarez-Sabin J. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Dec;23(12):1403-7.
- 146 - Shiro Uemura, Hidetsugu Matsushita, Wei Li, Alexander J. Glassford, Tomoko Asagami, Keun-Ho Lee, David G. Harrison, Philip S. Tsao. Diabetes Mellitus Enhances Vascular Matrix Metalloproteinase Activity. Role of Oxidative Stres. *Circ Res.* 2001;88:1291-1298.
- 147 - Massengale JL, Gasche Y, Chan PK. Carbohydrate Source Influences Gelatinase Production by Mouse Astrocytes In Vitro. *GLIA* 38:240-245 (2002)

-
- 148 - Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. 1992. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41:29–34
- 149 - Brown PD. 1998. Synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. In: Parks WC, Mecham RP, editors. *Matrix metalloproteinases*. San Diego, CA: Academic Press. p 243–26
- 150 - Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267–283.
- 151 - Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135–1149.
- 152 - Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. 1992. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 267:17321–17326.
- 153 - Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. 1998. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020–1030.
- 154 - Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. 2000. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 31:3034–30
- 155 - Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1992. TIMP-2 reduces proteolytic opening of bloodbrain barrier by type IV collagenase. *Brain Res* 576:203–207.
- 156 - The NINDS rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581–1587.
- 157 - Adams HP Jr, Brott TG, Furlan AJ, et al. Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 1996;27: 1711–1718.
- 158 - Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, et al. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res*. 1981;41: 4629–4636.

-
- 159 - Carmeliet P, Moons L, Lijnen HR, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 1997;17:439–444.
- 160 - Lijnen HR, Silence J, Lemmens G, et al. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 1998;79:1171–1176.
- 161 - Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M, Hamann FG. Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia. *Neurol Res.* 2005 Mar;27(2):212-7.
- 162 - Montrucchio G, Lupia E, De Martino A, et al. Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils: involvement of plateletactivating factor and P-selectin. *Circulation.* 1996;93:2152–2160.
- 163 - Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke.* 1999;30:624–629.
- 164 - Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:1373–1378.
- 165 - Lijnen HR. Plasmin and Matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 86:324-333.
- 166 - Fisher CM, Adams RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic transformation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1951; 10: 92–94.
- 167- Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenaseinduced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21:801–807.
- 168 - Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 2002;33:831–836.