



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMANIN
GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE
NÖRON KORUYUCU ETKİLERİ**

Dr. M. Özgür TAŞKAPILIOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Bursa - 2006



**T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMANIN
GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ MODELİNDE
NÖRON KORUYUCU ETKİLERİ**

Dr. M. Özgür TAŞKAPILIOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ender KORFALI

Bursa - 2006

İÇİNDEKİLER

1. TÜRKÇE ÖZET.....	ii
2. İNGİLİZCE ÖZET.....	iii
3. GİRİŞ	1
4. GEREÇ VE YÖNTEM	11
5. BULGULAR	16
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	19
7. KAYNAKLAR	25
8. TEŞEKKÜR	30
9. ÖZGEÇMİŞ	31

ÖZET

İskemik streten saatler-günler önce karşılaşılan öldürücü olmayan önkoşullamanın, stroke'tan koruyucu olduğu uzun süreden beri bilinmesine rağmen reperfüzyonun başlangıcında kısa süreli ve birbirini takip eder şekilde uygulanan reperfüzyon-reoklüzyon (ardkoşullama) dönemlerinin iskemik hasardan koruyucu özelliği yeni gösterilmiştir.

Çalışmamızda, intraluminal filament yöntemi ile geçici fokal serebral iskemi yaratılan sıçanlarda iskemik ön ve ardkoşullamanın ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının nöron koruyucu etkileri araştırıldı.

Geçici fokal serebral iskemi, 32 adet, (275±25 gr) Sprague-Dawley erkek sıçanda intraluminal filament yöntemi ile gerçekleştirildi. Sıçanlar, oklüzyon (Grup I; n=8), önkoşullama (Grup II; n=8), ardkoşullama (Grup III;n=8), ön ve ardkoşullama grupları (Grup IV; n=8) olarak ayrıldı. Sol orta fossaya burr-hole açılarak yerleştirilen serebral doku O₂ probu ile ölçüldü. Doku O₂ basıncı ölçümüne (PtiO₂), oklüzyon süresince devam edildi. Dekapitasyonu takiben alınan beyin kesitleri, 2,3,5-Trifeniltetrazolium klorid (TTC) ile boyandı ve infarkt alanı hesaplandı.

Orta serebral arter (OSA) oklüzyonu uygulanan tüm sıçan gruplarında PtiO₂ değerlerinde anlamlı düşüş saptandı (p<0.005). Önkoşullama, ardkoşullama ve ön-ardkoşullama birlikte uygulanan gruplarda infarkt hacminin OSA oklüzyonu uygulanan gruba göre anlamlı olarak azaldığı (p₁₋₂<0.001, p₁₋₃=0.021, p₁₋₄=0.05) fakat ön-ardkoşullamanın birlikte uygulanmasının infarkt hacmi üzerinde daha fazla korunma sağlamadığı izlendi (p₂₋₄>0.05).

Anahtar kelimeler: Ardkoşullama; iskemi; serebral doku oksijen basıncı;orta serebral arter iskemisi; önkoşullama; sıçan

SUMMARY

Neuronal Protective Effects Of Ischemic Pre- and Postconditioning With Focal Cerebral Ischemia Model Of Rats

Preconditioning, several hours or days before an ischemic stress has been known to protect against stroke. On the other hand, brief alternating periods of reperfusion-reocclusion at the beginning of reperfusion (postconditioning) has recently been shown to reduce ischemic damage.

Our study is aimed to find out the changes due to ischemia and the effect of ischemic pre- and postconditioning on cerebral O₂ pressure and tissue O₂ pressure and neuronal protection by using tissue O₂ pressure monitoring in rats in which transient focal cerebral ischemia model.

Transient focal cerebral ischemia was produced by intraluminal filament method in 32 Sprague-Dawley male rats (275±25 gr). Rats were divided into occlusion (Group I; n=8), preconditioning (Group II; n=8), postconditioning (Group III;n=8), both pre- and postconditioning groups (Group IV; n=8). Tissue pressure (PtiO₂) was measured by tissue O₂ probe which was placed into left middle fossa through a burr-hole during whole occlusion procedure. Following decapitation, brain slices were obtained and they were stained with 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) and infarct area was calculated.

The PtiO₂ values were significantly decreased in all middle cerebral artery (MCA) occluded rats ($p < 0.005$). Infarct volume significantly decreased in preconditioning, postconditioning and both pre- and postconditioning groups when compared with MCA occlusion group ($p_{1-2} < 0.001$, $p_{1-3} = 0.021$, $p_{1-4} = 0.05$) but comparison of preconditioning, postconditioning and both pre- and postconditioning groups with each other showed that their effect on infarct volume was not significantly different from each other and pre and post condition together did not add further protection ($p_{2-4} > 0.05$).

Key words: Cerebral tissue oxygen pressure; middle cerebral artery occlusion; ischemia; preconditioning; postconditioning; rat

GİRİŞ

Similia similibus curentur
Hippocrates

Adaptasyon Darwin'in öne sürdüğü gibi sadece türler düzeyinde değil doku, hücre, molekül ve hatta genler seviyesinde de işleyen fizyolojinin temel doktrinlerinden birisidir. Son yıllarda strokla ilgilenen nörobilimciler memeli beyninin serebral iskemi gibi hasarlanmalara adapte olabileceğini, dolayısıyla daha sonra gelişen hasar yapıcı olaylara karşı hücre yaşamının korunarak devam edebileceği konusunda pek çok kanıta ulaşmışlardır. Strese yanıt olarak çıkan bu koruyucu fenotipin gelişmesi; genomik, moleküler, hücresel ve doku düzeyindeki koordineli yanıtla bağlıdır (1).

Bir uyarıcı veya ilacın değişik dozları normal etkisinin tersi etki de gösterebilir. Hipokratın meşhur aforizması '*Similia similibus curentur*' (benzerler benzerleri ile tedavi edilir), Arndt-Schultz'un '*zehirler küçük dozlarda uyarıcılardır*' deyimleri koruyucu mekanizmaların hem yararlı hem de zararlı olabilecek etkilerinin çok uzun yıllardır bilindiğini göstermektedir.

1964 yılında Dahl ve ark.'ları, Gidday'in serebral önkoşullama ve iskemik toleransla ilgili makalesinde belirttiği gibi, sıçan beyninin kısa süreli anoksiyi takip eden daha uzun süreli bir anoksiye karşı geliştirdiği dayanıklılık kapasitesini in vivo olarak göstermişlerdir (1). Bu araştırma, serebral önkoşullama ile ilgili literatürdeki ilk çalışmadır. 1986 yılında Schurr ve ark.'ları önceden kısa süreli anoksiye maruz kalan hipokampal CA1 nöronlarının, daha sonra tekrar anoksi ile karşılaştıkları zaman elektriksel uyarılmış diken dalga amplitüdlerinin değişmediğini saptamışlardır (2). Aynı yıl, Murry ve ark.'ları kısa süreli koroner iskemi oluşturdukları köpeklerde kardiyak önkoşullamanın daha sonra gelişen koroner iskemiden koruyucu olduğunu bildirmişlerdir (3). Kitagawa ve ark.'ları gerbillerde iskemiden iki gün önce kommon karotid arterdeki kan akımının kısa süreli kesintiye uğratılmasının hipokampal CA1 piramidal hücrelerinde global iskemi sonrası gerçekleşmesi beklenen gecikmiş nöronal ölümü tamamen önleyebileceğini göstermişlerdir (4).

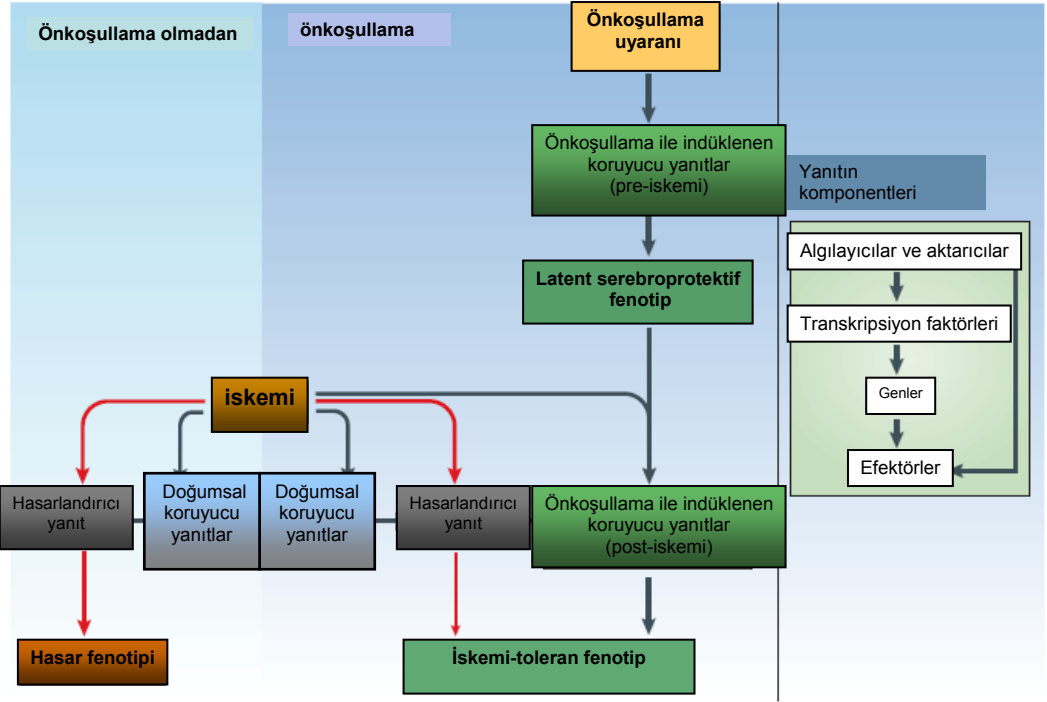
Organizmalar potansiyel olarak tekrar oluşacak darbelere koruyucu mekanizmalarla karşılık verirler. Ağır hipoksik-iskemik stresten saatler veya günler önce öldürücü derecede olmayan hipoksik stres uygulanmasının 'önkoşullama' hücre ölümünü azaltabileceği gösterilmiş ve bu olay 'tolerans' olarak tanımlanmıştır (1). İskemik önkoşullamanın insan beyninde de oluşmasının muhtemel olduğu öne sürülmüştür (5). Tolerans gelişimini sağlayan önkoşullama uyarıları: iskemi, hipoksi, hipotermi, hiperbarik oksijenizasyon veya metabolik inhibitörler sonucu oluşabilir (5). Beyin hücreleri, önkoşullama olmaksızın bile, iskemiye cevap olarak savunma sistemlerini harekete geçirerek hücrel hasarı ve ölümü azaltmaya çalışır (6). Pratik olarak nöral travmaya neden olan herhangi bir uyarı, harabiyete neden olabilecek doz eşiğine yakın fakat harabiyete neden olmayacak derecede uygulandığı zaman santral sinir sistemini daha sonraki iskemiye veya travmaya karşı dayanıklılığını arttıran kuvvetli endojen yolları upregüle ederek korur (7). İskemik önkoşullama potansiyel olarak; iskemi, hipoksi veya inflamasyon gibi zararlı uyarılara karşı akut veya kronik reaksiyon olarak da tanımlanabilir.

Serebral iskemik önkoşullama, ilk defa global serebral iskemi modelinde iskemiye karşı 24 saat sonra tolerans oluşturmak amacıyla iki dakikalık geçici iskemi oluşturulduktan sonra gösterilmiştir (7). Kısa süreli global iskemi sonrası oluşan serebral korunmanın %20-91 oranında olduğu daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla da saptanılmıştır (8).

Serebral iskemik tolerans/önkoşullama hem global hem de fokal iskemi sonrası gelişebilir ve her iki iskemi şeklinin de diğer tip iskemiden serebrumu koruma kapasitesine sahip olduğu Yanamoto tarafından gösterilmiştir (9). Serebral iskemik tolerans/önkoşullama; kimyasal, farmakolojik, elektriksel ve anoksik/iskemik olarak ortaya çıkarılabilir. Beyinde iskemik önkoşullamanın muhtemel mekanizmaları arasında; yayılan kortikal depresyon, K⁺ depolarizasyonu, oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, iyon kanallarının inaktivasyonu ve nörotransmitterlerin salınmasında azalma sonucu eksitotoksisitede azalma, antioksidan ve/veya antiapoptotik enzimlerin aktivitesinin artması, yeni koruyucu gen ekspresyonu (HSP'ler gibi), sitokinler sayılabilir (9). Ayrıca epilepsilerin de daha sonraki iskemiden nöral korunma

sağladığı saptanılmıştır (10). Adenozin, K_{ATP} kanallarının ve protein kinaz C'nin serebral önkoşullama da kardiyak korunmada olduğu gibi etkili oldukları da düşünülmüştür (9).

Önkoşullama, memelilerde en az iki farklı zaman dilimine yayılmış toleransı indükler (Şekil 1).



Şekil 1: Önkoşullamanın sağladığı serebral korumanın gelişimi (Gidday JM, 2006'dan adapte edilmiştir).

Akut etki-dakikalar, geç etki ise saatler içerisinde gelişir (11, 12). Akut önkoşullama da, önkoşullama uyarısıyla karşılaşmayı takip eden dakikalar içinde değişiklikler olurken, klasik önkoşullamanın ortaya çıkması için saatler hatta günler gereklidir (1). Başka bir önkoşullama uyarısı olmazsa ilk uyarının sağlayacağı koruma günler içerisinde azalır. Tek başına önkoşullama, hücre ve dokularda adaptif reaksiyonlara yol açarak bir süre sonra latent serebral koruyucu fenotipin ortaya çıkmasını sağlar. Bu olay beyni daha sonra gelecek gerçek hasarlandırıcı olaya hazırlar. Gecikmiş iskemik önkoşullamaya yanıtın gelişmesi günler/haftalar alabilir. Yeni gen ekspresyonu ve protein sentezi gerektirir (1, 13).

İskemik önkoşullamanın koruma mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Çalışmalarda iskemik önkoşullamanın gelişmesinde indüksiyon, transdüksiyon ve tolerans olmak üzere 3 ayrı evre olduğu saptanılmıştır (1). İndüksiyon evresinde N-Methyl-D-Aspartate, adenozin reseptörleri ve muhtemelen de serbest radikallerin mevcudiyetine gereksinim vardır. Ayrıca, enerji metabolizmasının korunması da gerekir. Protein kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve immediate erken gen ekspresyonları, eritropoietin, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α, ısı şok proteinleri (HSP), Bcl₂, sinyallerin tolerans cevabına dönüşmesinde etkili olur. İskemik tolerans değişik evrelerde görülebilir. Önkoşullama uyarısından sonra, korunmanın erken fazları saatlerce devam edebilir. Korunmanın geç evreleri ise 2-4 gün sürebilir ve multipl genlerin ekspresyon veya re-ekspresyonu ile genetik yeniden şekillenme "remodelling" oluşur (1).

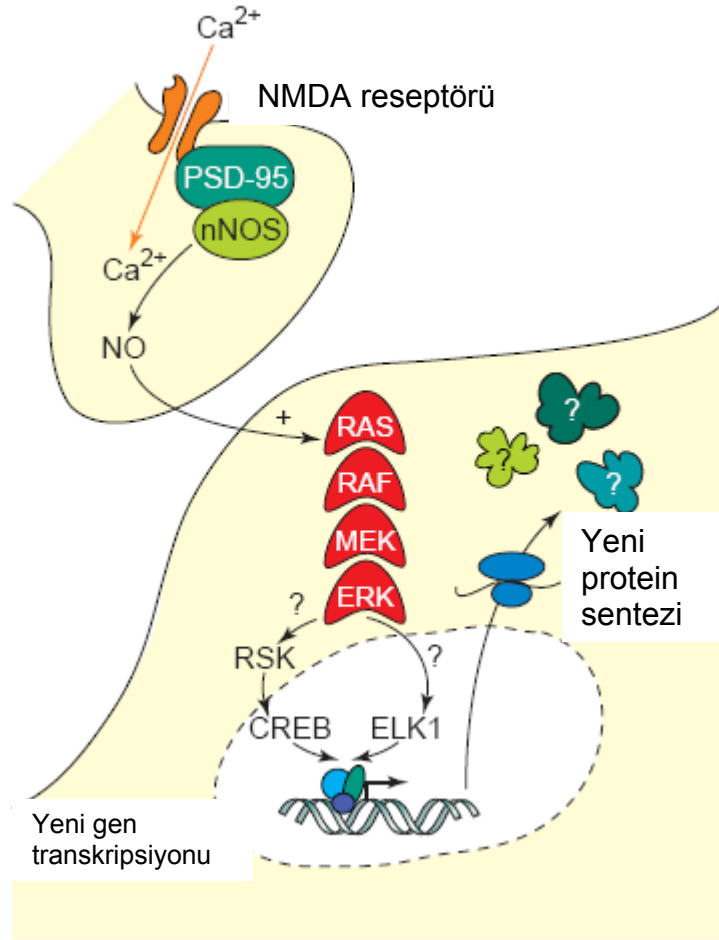
Önkoşullama Uyarıları

Belirli bir stres uyarısının yoğunluğu, süresi ve/veya frekansındaki farklılıklar, bu uyarının herhangi bir yanıt yaratamayacak kadar zayıf mı, önkoşullama yapacak güçte mi yoksa zararlı düzeylerde mi olduğunu belirler. Dolayısıyla, iskemik beyin hasarına yol açtığı bilinen glutamat, reaktif oksijen radikalleri, inflamatuvar sitokin ve kaspaz gibi moleküller daha düşük seviyelerde önkoşullama uyarısı olarak rol oynayarak adaptif mekanizmaları tetikler (13, 14).

Kısa süreli serebral iskemi veya hipoksi, önkoşullama oluşturan uyarıların prototipini oluşturmakla beraber aslında iskemik veya hipoksik özellikte olmayan; yayılan kortikal depresyon, hiperoksi, oksidatif stres, uzamış hipoperfüzyon, hipertermi veya ısı şoku gibi değişik tipteki endojen veya ekzojen uyarılara maruz bırakılan hayvan ve hücrelerde de iskemik toleransın olduğu gösterilmiştir (15, 16). Değişik uyarıların beyinde iskemiye dirençli fenotip oluşturabilme kapasitesi, farklı uyarıların aktive ettiği yolların korumadan sorumlu ortak bir mekanizmada birleştiğini düşündürmektedir (17).

Alıcı ve Aktarıcılar

Tolerans oluşması için önkoşullama yaratan uyarının, nörotransmitter, nöromodülatör, sitokinler, iyon kanalları ve redoks duyarlı enzimler gibi moleküler sensorlar tarafından daha kuvvetli bir hasarın habercisi olarak algılanması gerekir (18). Sensörler, transdüksiyon yollarını aktive edip adaptif yanıtı başlatır. Bu transdüksiyon yollarının üyeleri; mitojenle aktif protein kinazlar (MAPK'lar) ve bunların Ras, Raf, MEK ve ERK alt grupları, mitokondrial ATP-duyarlı K^+ (K_{ATP}) kanalları, protein kinaz B olarak da bilinen Akt ve protein kinaz C- ϵ izoformudur (Şekil 2).



Şekil 2: Nöronal iskemik önkoşullamada sinyal kaskadı (Dawson VL, 2000 (19) adapte edilmiştir).

Mitojenle aktive protein kinazlar (MAPK) ökaryotlarda korunmuş serin/treonin protein kinaz ailesidir. Bunlar hücre proliferasyonu, farklılaşması, hareketi ve ölümü gibi pek çok hücre programla ilişkilidir.

MAPK sinyal kaskatları 3 basamaklı bir modül şeklinde hiyerarşik olarak organize olmuştur. MAPK'ler MAPK kinazlar (MAPKK) tarafından fosforlanır ve aktive edilir; MAPK'lar da MAPKK-kinazlar (MAPKKK) tarafından fosforlanır ve aktive edilir. MAPKKK'lar GTPaz ve/veya diğer protein kinaz ailesinin etkileşimi ile aktive olur. Bu da MAPK modülünün hücre yüzey reseptörleri veya dış uyaranlarla bağlantısını sağlar.

Drozofiladaki nitrik okside dayalı adaptif yanıtın evrimsel olarak korunmuş olma ihtimali, bu multifonksiyonel modülatörün önkoşullama stresinin mantıklı bir otokrin ve parakrin mediatörü olabileceğini düşündürmektedir (20). Endotel ve nöronal kaynaklı nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın indüklenabilir izoformlarının, transdüksiyon işleminde rol aldığına dair kanıtlar gittikçe birikmektedir (21, 22). Pek çok kinaz ve transkripsiyon faktörünün redoks duyarlılığının olması, reaktif oksijen radikallerinin de transdüser olarak görev yapabileceğine işaret etmektedir.

Üretimi ATP oluşumuna bağlı olan adenzinin de bazı modellerde toleransı indüklediği gösterilmiştir. Siklik AMP duyarlı element bağlayıcı protein (CREB), nükleer faktör- κ B (NF- κ B)'nin p50 ve p65 alt üniteleri, protein kinaz C ve diğer kinazlar kaspaz substratları olup kaspazların önemli indüksiyon katalizörleri olduğunu düşündürmektedir. Bu bahsedilen moleküler transdüserler ve ara uyaranlar, iskemik toleransın olduğu fenotipte iskemi sonrası efektörler olarak da rol alabilir.

Transkripsiyon faktörleri

Aktive edici protein 1 (AP1), CREB, NF- κ B, erken büyüme yanıtı 1 (EGR-1) ve redoksla regüle transkripsiyonel aktivator SP1, hipoksi/iskemi ile düzenlenmeye duyarlı olduğu bilinen transkripsiyon faktörlerinden bazılarıdır.

Efektörler

İskemiye toleranslı beyindeki cevaptan büyük gen aileleri sorumludur (1). Bu genlerin çoğu, önkoşullama ile aktive olan transkripsiyon faktörlerinden sorumlu ortak promoter sekansları paylaşır. Önkoşullamaya yanıt olarak hücre siklusu, metabolizma, inflamasyon, eksitotoksisite, iyon homeostazı, sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genler eksprese edilir (23, 24).

Önkoşullamaya cevaben aktive olan genler, tek başına iskemi ile ilişkili genlerden biraz daha farklıdır. Benzer şekilde, önkoşullama yapılmış hayvanda iskemiye yanıtın genomik ekspresyon yapısı, önkoşullama yapılmamış hayvandaki önkoşullama veya iskemi ile aktive edilen yapıdan farklıdır (23).

Sonuç olarak, önkoşullama sonrası veya önkoşullama yapılmış beyinde iskemi sonrası gen transkripsiyonundaki değişiklikler birbirinden farklıdır. Önkoşullama sonrası adenosin A_{2a} reseptörü, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi genler, dakikalar veya saatler içinde eksprese veya represe olurken, β -aktin, serin/treonin protein kinaz, araşidonat 12-lipooksijenaz, kalretinin, S100A5 kalsiyum bağlayıcı protein, dihidroprimidin dehidrogenaz ve çinko taşıyıcı ZnT1 gibi genler günler sonra etkilenir. CCAAT/artırıcı-bağlayıcı protein ilişkili transkripsiyon faktörü, adenosin A_{2a} reseptörü ve metallothionein II geçici olarak değişim gösterirken HSP'leri, BCL₂, p38-MAPK, TGF β 1, I κ -B α , glial fibriller asidik protein (GFAP) ve β -tubulin değişimi uzun sürelidir (25).

İskemik toleransın hücresel seviyedeki efektörleri, hücre zarı, sitoskeleton, mitokondria ve hücre metabolizmasında geniş etkisi olan diğer organellerin yapısal ve fonksiyonel proteinlerini kapsamaktadır (1). Önkoşullamadan sonra hücresel seviyede, protein içeriğinin de (stres proteinleri, kinaz ve fosfotazlar, transkripsiyon faktörleri, metabolik enzimler, taşıyıcı ve yapısal proteinler, trofik faktörler, plastisite ilişkili moleküller, hücre siklusu/apoptoz ilişkili proteinler) önemli değişimler olur. Bu yeni protein içeriği, gelecek iskemik tehdide karşı koymaya çalışan dokunun yaptığı hazırlığın habercisidir (1).

Her ne kadar serebral önkoşullamanın hücresel hedefi nöronlar olarak kabul edilse de endotel ve düz kas hücreleri seviyesinde gerçekleşen iskemik tolerans da nöronal korumaya önemli katkı sağlar. İskemi öncesi ya da iskemi sırasında doku düzeyinde mutlak bölgesel kan akımı ve serebral metabolizma önkoşullamadan etkilenmemektedir. Fakat kalıcı fokal stroke sonrası, mutlak ve rölatif kan akımındaki azalma önkoşullama yapılarak azaltılabilir. Bu duruma, histolojik olarak mikrodamarlanmada artışın da eşlik

ettiği gösterilmiştir (26). Global iskemiye takiben gerçekleşen reperfüzyonun erken dönemlerinde gözlenen hipoperfüzyon, önkoşullama ile tersine çevrilebilir. Önkoşullama yapılmış beyinde, iskemi sonrası endotel bağımlı vazodilatasyonun daha iyi korunduğu gösterilmiştir (27).

Hızlı oluşturulan serebral iskemik toleransla ilgili yayınlanan az sayıda deneysel çalışma olmasına rağmen, bu çalışmalarda sıçanlarda yapılan global iskemi modellerinde 2 dakika süre ile uygulanan önkoşullamanın, koşullamadan 30 dak. sonra uygulanan 10 dak. iskemiye karşı tam nöral korunma sağladığı gösterilmiştir. Buna karşılık 3 günlük reperfüzyondan sonra gözlenen nöron koruyucu etkinin, reperfüzyonun 7 güne kadar uzatılmasıyla ortadan kalktığı görülmüştür (11). İskemik travmanın 7 dak. kadar kısaltılması ise önkoşullama ile sağlanan koruyucu etkinin 7 günden daha fazla sürmesine neden olur (11).

Klinik çalışmalarda iskemik önkoşullama, stroke'lu hastaların tedavilerinde yeni iskemik olayların oluşmasının önlenilmesinde kullanılmamasına rağmen benzer şekilde iskemik önkoşullamanın kendiliğinden oluştuğunu gösteren iki retrospektif çalışma yayınlanmıştır (28, 29). Moncayo ve ark., çalışmalarında 20 dak. daha fazla sürmeyen geçici iskemik olayın optimal şartlarda daha sonra uygulanan iskemiden koruduğunu saptamışlardır (28). Wegener ve ark. iskemik önkoşullama fenomeninin geçici iskemi geçiren olgularda daha sonra oluşan ipsilateral iskemik stroke'un daha iyi prognozla sonuçlandığını rapor etmişlerdir (29). Her ne kadar bu çalışmalar geçici iskeminin daha sonra gelişen iskemik stroke'tan koruduğunu göstermeseler dahi, belli bir zaman dilimi içinde oluşan iskemik olayın daha hafif olduğunu ve daha az nörolojik bozukluk yarattığını gözlemişlerdir. İskemik önkoşullamaya yanıtın 7 gün kadar sürdüğü ve en geç 14 gün sonra kaybolduğu rapor edilmiştir (29). Bu çalışmaların sonuçları, kalıcı iskemiye karşı en iyi koruyucu zaman aralığının bir haftadan daha fazla olmaması gerektiğini göstermektedir.

İskemik önkoşullama, endojen nöral korunma mekanizmalarından sorumlu moleküler mekanizmalara yeni bir bakış açısı getirmekte ve beyin

hücrelerinin iskemik travmaya karşı daha dayanıklı hale getirilebilmeleri için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir.

İskemiye takiben reperfüzyonun erken döneminde kan akımının hızlı ve aralıklı olarak kesintiye uğramasına ise ardkoşullama denir. Reaktif O₂ ürünleri ile klasik ligand uyarılarının, ardkoşullamada uyarıcı olarak rol oynadığı, K_{ATP} kanalları ve protein kinaz C yollarının ise mediatör görevi yaptığı kabul edilmektedir (30). Ön ve ardkoşullamada benzer yollar ve moleküller yer alsa bile rolleri ve zamanlamaları her iki durumda farklı olmaktadır (30). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise Zhao ve ark.'ları ardkoşullamanın apoptoz ve serbest O₂ radikallerinin salınımının önlenmesi ile infarkt hacmini azalttığını, ancak stroke tedavisi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir (31).

Akut beyin hasarı sonrası gelişen ikincil hasarın saptanmasında, intrakraniyal basınç (İKB) ölçümü kullanılmaktadır. Nöro-Yoğun Bakım sürecinde, İKB ölçümü çok önemli bir dönüm noktası olmakla beraber hasarlı beyindeki oksijenizasyonun gerçek durumunu göstermez. Jugular venöz O₂ saturasyonu, beyin doku O₂ basıncı, yakın infrared spektroskopi ile beraber olan transkraniyal serebral oksimetri, pozitron emisyon tomografi oksidatif metabolizma, single-foton emisyon kompüterize tomografi/kompüterize tomografi perfüzyon ve fonksiyonel görüntüleme ve mikrodializ kullanılarak serebral metabolit ölçümü, serebral oksijenizasyon ve metabolik durumun direkt monitörizasyonu için son yıllarda geliştirilen tekniklerdir (32).

Devamlı olarak hasta başında ölçüm yapılabildiği için beyin dokusundaki oksijen basıncı (PtiO₂)'nin nöromonitorizasyonu, serebral oksijenizasyonun belirlenmesi için "altın standarda" en yakın yöntemdir.

Beyin PtiO₂'si çoğunlukla frontal beyaz cevhere yerleştirilen ve kraniuma özel bir vida ile fikse edilen, <0.5 mm çapında ve 5 mm uzunluğunda bir mikrokaterle değişik sistemler kullanılarak etkin şekilde ölçülebilir. En sık Licox® (IntegraNeuroSciences, San Diego, CA, ABD) ve Neurotrend® (Neurotrend, Johnson & Johnson, Raynham, MA, ABD) sensörleri kullanılmaktadır. Her iki sistem de etkin şekilde O₂ doku basıncını ölçmesine rağmen, Licox problemleri ile bunun daha kesin olarak yapıldığı in

vitro deneylerle gösterilmiştir. Licox mikrokateri Clark tipinde polarografik bir yöntemle PtiO₂ ölçümü yaparken Neurotrend mikrokateri ise PtiO₂, PtiCO₂ ve PtiH ölçmek için optik luminessensi kullanır (33).

Literatürde orta serebral arterleri (OSA) tıkanan sıçanlarda mannitol, hiperbarik oksijen, magnezyum gibi ajanların etkisinin, nörolojik defisit skalaları, diffüz optik tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kullanılarak saptandığı, infarkt hacmi ile değerlendirildiği görülmüş ancak O₂ basınç sensörleri ile ölçüme rastlanmamıştır (34, 35).

Çalışmamızda, intraluminal filament yöntemi ile geçici fokal serebral iske mi yaratılan sıçanlarda beyin doku O₂ basıncı monitörizasyonu uygulanarak, iskemik ön ve ardkoşullamanın doku oksijenizasyonu ve serebral infarkt hacmi üzerinde tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının nöron koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı. Daha önce iskemik ön veya ard koşullamanın serebral infarkt hacmi üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmış olmasına rağmen her iki durumun etkisinin birlikte incelendiği bir çalışma yapılmamıştır (31, 36, 37).

GEREÇ VE YÖNTEM

Tüm deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesinin 16.05.2006/5 karar no'lu izni ile onaylandı ve lokal etik komitenin bilgisi dahilinde gerçekleştirildi.

Otuz iki adet, 275±25 gr ağırlıktaki Sprague-Dawley erkek sıçan, deney gününe kadar, sıcaklığı 21±1 °C olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, her biri ayrı kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular.

Sıçanlara anestezi indüksiyonu %4 izofluran (Isoflurane, Abbott Labs, Queenborough, İngiltere) ile sağlandı. Devam dozlaması ise %70 N₂O ve %30 O₂ gaz karışımı içerisinde %2 izofluran ve spontan solunumda yüz maskesiyle sürdürüldü. Anestezi derinliği her 15 dakikada bir kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi. Deney süresince rektal proba (Temperature controller probe, CMA, İsveç) sıçanların vücut sıcaklıkları monitörize edildi ve sıcaklık kontrollü ped üzerinde 37,09±0,07 °C'de tutuldu. Tüm cerrahi işlemler mikroskop (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) altında gerçekleştirildi.

Serebral Doku O₂ Basıncının Ölçülmesi

Serebral doku O₂ probu (LICOX PMO Brain Oxygen Monitoring System, Integra LifeSciences, NJ, ABD), sol orta fossaya yüksek hızlı drill (Aesculap Microtron GD 412, Tuttlingen, Almanya) ile burr-hole açılarak yerleştirildi. Doku O₂ basıncı ölçümü (PtIO₂), OSA oklüzyonu öncesi 10 dakikalık kalibrasyon süresini takiben başlatıldı ve oklüzyon süresince devam edildi.

Geçici Fokal Serebral İskemi Oluşturulması

Geçici fokal serebral iskemi Kawamura'nın 1991 yılında tanımladığı intraluminal filament yöntemi ile gerçekleştirildi (38).

OSA oklüzyonu için, ventral orta hat boyun insizyonu yapılarak sol karotis bifurkasyonu ortaya konuldu. Arteria karotis kommunis ve arteria karotis interna, komşu vagus sinirinden dikkatlice ayrıldıktan sonra arteria karotis eksterna distalinden bağlandı. Oksipital ve pterigopalatin arterler

elektrokoagüle edildi. Takiben arteria karotis kommunis ve arteria karotis internaya anevrizma klibi yerleştirilerek kan akımı kesildi ve arteria karotis eksternaya arteriotomi yapıldı. Arteria karotis kommunis ve arteria karotis eksterna bifurkasyonunda 17-22mm uzunluğunda ucu silikon ile güçlendirilmiş 3-0 monofilament naylon sûtür (Ethilon, Ethicon Inc., Somerville, NJ, ABD) arteria karotis internanın lümeni içerisinde, OSA'nın ostiumunu kapatana dek fazla kuvvet uygulanmadan ilerletildi. Arter, bifurkasyon noktasından bağlanarak sûtür sabitlendi. OSA oklüzyonunun gerçekleştirildiği serebral doku O₂ probundan (PtiO₂) ölçümler ile denetlenildi.

Deney Grupları

Grup I (n=8) (Oklüzyon grubu) sol orta fossaya PtiO₂ probu yerleştirilmesini takiben intraluminal sûtür yöntemi ile 120 dakika süre ile OSA oklüzyonu uygulandı. Sıçanlar derlenme süreci için sıcaklığı 21±1°C olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, her biri ayrı kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldu. 24 saat sonra tiyopental sodyum (Pental Sodyum, I.E.Ulagay, İstanbul) anestezisi ile öldürülen sıçanların beyinleri süratle çıkarılarak, soğutulmuş beyin matriksinde (Zivic Labs, Portersville, PA, ABD) 2 mm kalınlığında 4'er adet koronal kesit alındı. Bu kesitler enfarkt hacminin hesaplanmasında kullanıldı.

Grup II (n=8) (Önkoşullama grubu) sol orta fossaya serebral PtiO₂ probu yerleştirilmesini takiben OSA oklüde edildi. Monofilament sûtür OSA ostiumunda 10 dakika (önkoşullama) tutulduktan sonra çıkarıldı. 24 saat sonra serebral PbiO₂ tekrar yerine yerleştirilerek 120 dakika süre ile OSA oklüzyonu uygulandı. Derlenme süreci için sıçanlar sıcaklığı 21±1°C olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, her biri ayrı kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular. Reperfüzyonu takiben 24 saat sonra derin tiyopental sodyum anestezisi ile öldürülen sıçanların beyinleri süratle çıkarılarak, soğutulmuş beyin matriksinde 2 mm kalınlığında 4'er adet koronal kesit alındı.

Grup III (n=8) (Ardkoşullama grubu) sol orta fossaya serebral PtiO₂ probu yerleştirilerek 120 dakika OSA oklüzyonu uygulandıktan sonra üç kez 30 saniye aralıklarla ve 30 saniye süre ile (ardkoşullandırma) tekrar OSA oklüzyonu uygulandı. Derlenme süreci için sıcaklığı 21±1C° olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, her biri ayrı kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular. Sıçanlar 24 saat sonra derin tiyopental sodyum anestezisi ile öldürülen sıçanların beyinleri süratle çıkarılarak, soğutulmuş beyin matriksinde 2 mm kalınlığında 4'er adet koronal kesit alındı.

Grup IV (n=8) (Ön ve ardkoşullama grubu) sol orta fossaya serebral PtiO₂ probu yerleştirilmesini takiben OSA oklüde edildi. Monofilament sütür OSA ostiumunda 10 dakika tutulduktan (önkoşullama) sonra çıkarıldı. 24 saat sonra serebral PtiO₂ probu tekrar yerine yerleştirilerek 120 dakika süre ile tekrar OSA oklüzyonu uygulandı. Reperfüzyon öncesi üç kez 30 saniye aralıklarla ve 30 saniye süre (ardkoşullama) ile OSA oklüzyonu uygulandı. Derlenme süreci için sıçanlar sıcaklığı 21±1C° olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, her biri ayrı kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldu. 24 saat sonra derin tiyopental sodyum anestezisi ile öldürülen sıçanların beyinleri süratle çıkarılarak, soğutulmuş beyin matriksinde 2 mm kalınlığında 4'er adet koronal kesit alındı.

Nörolojik Semptomların Değerlendirilmesi

Tüm deney hayvanları cerrahiden 1 saat sonra Bederson ve ark.'larının 4 dereceli skalası ile değerlendirildi (39):

Evre 0: Nörolojik defisit yok

Evre 1: Ön bacakta fleksiyon

Evre 2: Dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç

Evre 3: Evre 2'ye dönme hareketinin eklenmesi.

Kesitlerin Boyanması

Oluşan infarkt alanını göstermek amacıyla, dekapitasyonu takiben süratle çıkarılan beyinlerin soğutulmuş beyin matriksinde koronal kesitleri

alındı. pH 8.5 olacak şekilde ayarlanan 100 cc fosfat buffer tampon içinde 1 mg 2,3,5-Trifeniltetrazolium klorid (TTC) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) eritildi. Beyin dilimleri bu solüsyon içinde etüv de 37-42 °C 'de 1 saat bekletildi. 15 dak. aralıklarla beyin dilimleri alt üst çevrilerek her iki yüzün eşit boyanması sağlandı (40). Boyanan kesitler %10'luk tamponlanmış formalin ile fikse edildi. Daha sonra her iki hemisferin boyanan ve boyanmayan alanları Image J (Bethesda, Maryland, ABD) yazılımı ile değerlendirildi. TTC boyaması sonrası infarkt alanı mitokondri iç membranındaki süksinat dehidrogenaz enzim inaktivasyonu nedeniyle boya tutmazken, normal beyin dokusu boyayı alarak kırmızı renkte izlendi (40). Böylelikle yapılan ölçümlerin güvenilirliği ve infarkt hacmi ile olan ilişkisi tespit edildi.

İnfarkt hacminin ölçülmesi

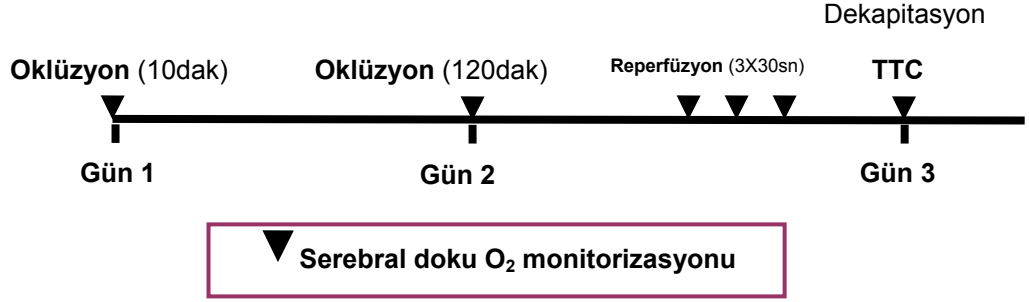
Sıçanlardan elde edilen serebral hemisferlerin TTC boyalı koronal kesitleri yüksek çözünürlüklü tarayıcı (HP, scanjet 4850, Palo Alto, CA, ABD) ile tarandı. Sınırları TTC boyası tutup tutmamasına göre belirlenen infarkt alanı, deney gruplarına kör bir araştırmacı tarafınca Image J (Bethesda, Maryland, ABD) yazılımı yardımıyla hesaplandı.

Alınan kesitlerde iskemi uygulanan hemisferin alanı hesaplanarak kontrateral hemisferin alanından çıkarıldı. Amacımız infarkt sırasında oluşabilecek doku kayıplarından etkilenmemektir.

İstatistiksel Analiz Yöntemi

Araştırmamızın verileri kodlanarak bilgisayarda değerlendirildi ve istatistiksel analizleri SPSS for Windows Ver. 13.0 Statistics modülünden elde edildi. Sürekli değerleri olan değişkenler için ortalama (\pm SS), kategorik değişkenler için sıklıklar (n ve %) kullanıldı. Ortalamalar için, gruplar arasında karşılaştırmalarda normallik testi uygulamasından sonra Kruskal Wallis testi, grupların ikili karşılaştırmaların da ise Mann-Whitney U testi yapıldı. Grup içi karşılaştırmalarda Wilcoxon sıra toplam testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde iki yanlı hipotez testleri ve 0.05 anlamlılık düzeyi kullanıldı.

Deneysel işlemlerin gruplara göre akışı şekil 1'de gösterildi.



- Grup 1: İskemi
- Grup 2: Önkoşullama
- Grup 3: Ardkoşullama
- Grup 4: Ön+ardkoşullama

Şekil 1: Deney akışı

BULGULAR

Tüm deney gruplarında sıçanların ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Grup1: 251,81±10,86; Grup 2: 273,47±17,63; Grup 3: 260,57±14,52; Grup 4: 255,81±11,08; p>0,05)

Gruplar arasında sıçanların vücut sıcaklıkları açısından da anlamlı fark saptanmadı (p>0.05) (Tablo 1).

Vücut sıcaklığı (°C)	Grup 1 n:8	Grup 2 n:8	Grup 3 n:8	Grup 4 n:8
	37,05±0,26	36,97±0,35	36,82±0,33	37,51±0,49

Tablo 1: Gruplar arasında sıçanların vücut sıcaklıkları.

Gruplar içinde açılış CCA, OSA serebral doku O₂ basınçları Wilcoxon sıra toplam testi kullanılarak karşılaştırıldı. Bunun sonunda 2., 3. ve 4. gruplarda, OSA ve CCO değerlerinin açılış basıncına göre anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (p<0.005) (Tablo 2).

Serebral PtiO ₂ (mmHg)	Grup 1 n:8	Grup 2 n:8	Grup 3 n:8	Grup 4 n:8
Açılış	14,97±5,30	24,70±6,35	23,27±4,70	38,60±8,85
CCAO	10,31±4,48	19,16±7,09	19,68±6,65	33,36±8,43
OSAO	6,61±3,47	16,26±6,92	16,25±4,82	29,48±7,20

Tablo 2: Grup içi serebral PtiO₂ değerlerinin karşılaştırılması (mmHg) (Ort±SEM) (CCAO: Kommon karotid arter oklüzyonu, OSAO: orta serbral arter oklüzyonu).

Kruskal-Wallis testi kullanılarak hesaplanan CCO ve OSA'nın açılış basıncına göre yüzde değişimi anlamlı bulunmamıştır (p>0.05)

Oklüzyon sonrası Bederson'un nörolojik skorlamasına göre yapılan nörolojik muayenede gruplar arasında anlamlı fark saptanılmadı (p>0.05) (14). Bu durum, OSAO'nun tüm gruplarda oluştuğunun kanıtı olarak kabul edildi (Tablo 3).

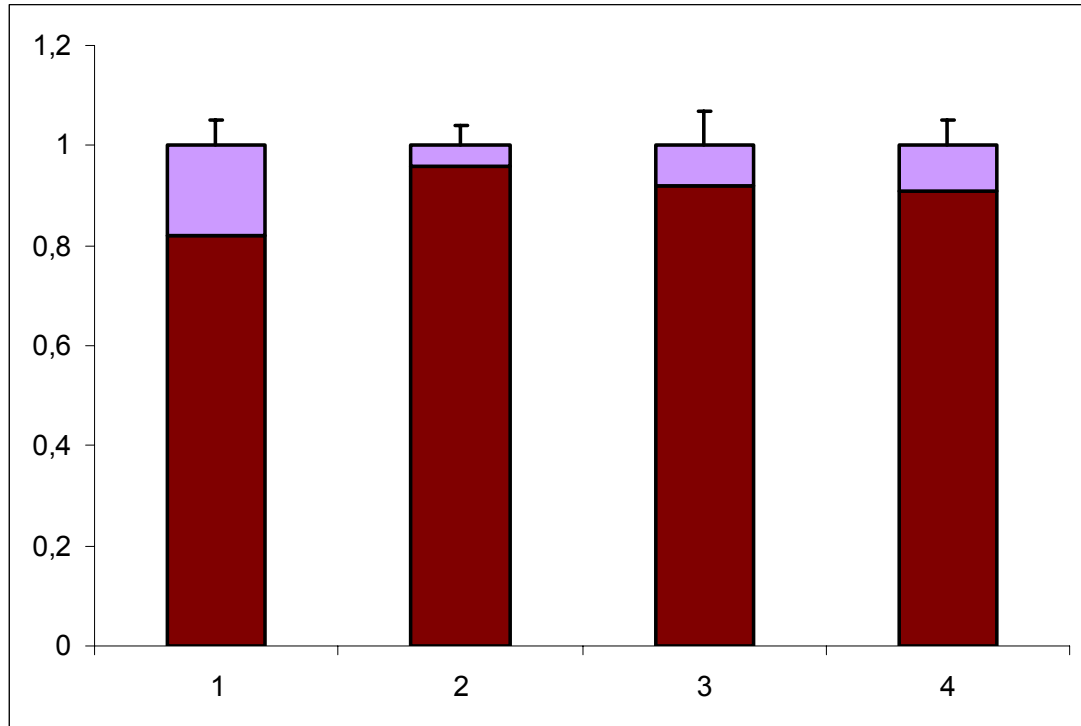
Nörolojik skor ortalamaları	Grup 1 n:8	Grup 2 n:8	Grup 3 n:8	Grup 4 n:8
	2,12±0,83	2,37±0,74	2,25±0,89	2,50±0,53

Tablo 3: İntralüminal sütün oklüzyonu sonrası deney gruplarının Bederson'un nörolojik skor ortalamaları (Ort±SD)

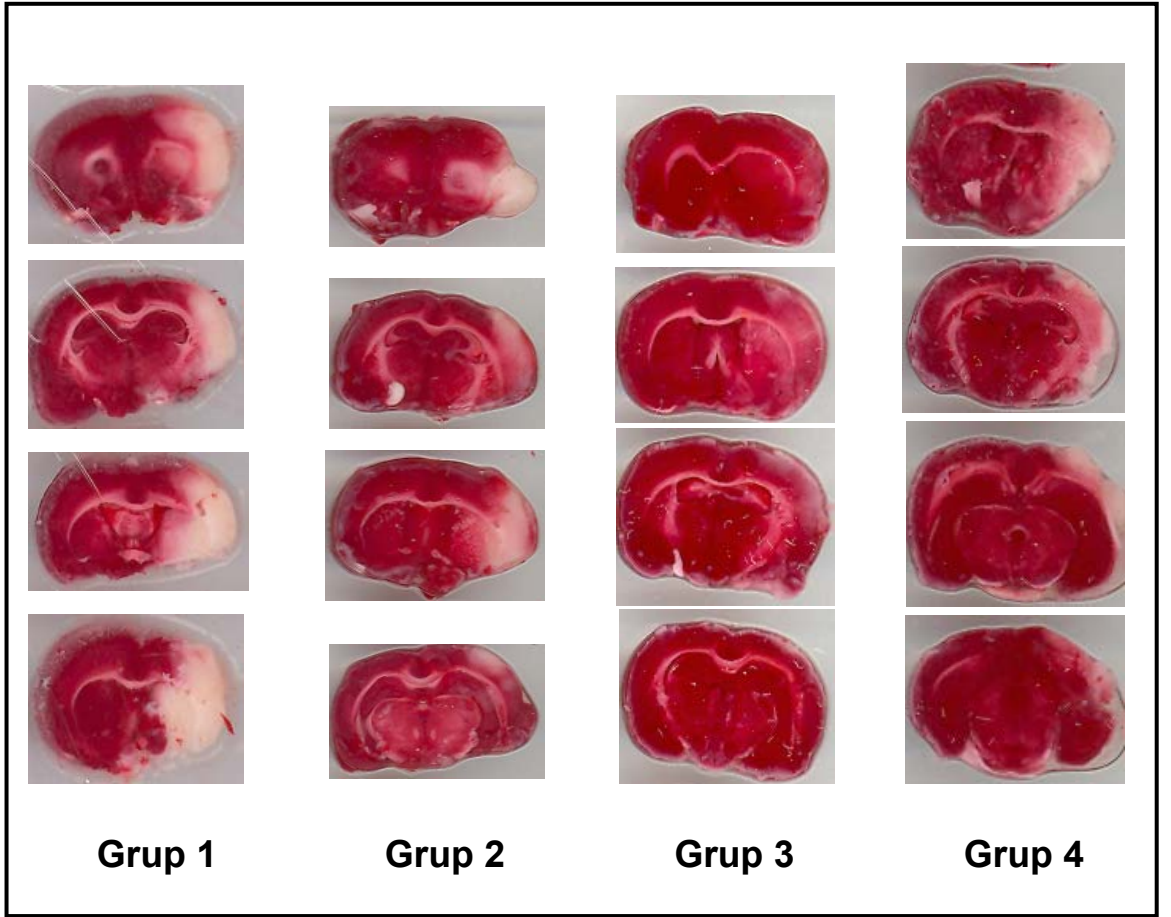
Gruplar arasında infarkt hacimleri Krusgal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptandı ($p=0.003$). Farkın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla gruplar ikiyeşerli olarak Mann-Whitney U testi ile tekrar karşılaştırıldı. Buna göre 1-2, 1-3 ve 1-4 grupları arasında infarkt hacim ortalamaları bakımından anlamlı farklılık saptandı ($p_{1-2}<0.001$, $p_{1-3}=0.021$, $p_{1-4}=0.05$, $p_{2-3}>0.05$, $p_{2-4}>0.05$, $p_{3-4}>0.05$) (Tablo 4, şekil 3).

İnfarkt hacmi	Grup 1 n:8	Grup 2 n:8	Grup 3 n:8	Grup 4 n:8
	0,18±0,05	0,04±0,04*	0,08±0,07*	0,09±0,05*

Tablo 4: İnfarkt hacimlerinin gruplara göre dağılımı (Ort±SD).



Şekil 3: İnfarkt hacimlerinin gruplara göre dağılım grafiği (Grup 1: iskemi, grup 2: önkoşullama, grup 3: ardkoşullama, grup 4: ön-ardkoşullama).



Şekil 4: Grupların TTC ile boyanan koronal kesitlerde infarkt alanları soluk olarak boyanmaktadır (Grup 1: İskemi, grup 2: önkoşullama, grup 3: ardkoşullama, grup 4: ön/ardkoşullama).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Serebral iskemi, kognitif bozukluk ve nöbetleri de içine alan geniş bir nörolojik bozukluk spektrumu içinde hem çocukluk hem de erişkin dönemde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni ve çeşitli etyolojik nedenlerle serebral kan akımının (SKA) azalması veya tam olarak durması sonucu oksijen, ATP ve glukoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan bir olaylar zinciridir (41).

Sıçanlarda intraluminal sütün ile OSA'nın tıkanması, kalıcı ve geçici fokal serebral iskeminin patofizyolojisini çalışmak için son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu model, Koizumi ve ark.'ları tarafınca tanımlanmış, daha sonra bunun pek çok modifikasyonu bildirilmiştir (42-44). Kolay yapılabilir oluşu, minimum girişimsel işlem gerektirmesi ve intrakraniyal basıncı etkileyebilecek kraniektomi gerektirmemesi nedeniyle çalışmamızda da bu modeli tercih ettik (38).

PtiO₂ monitörizasyonunun nöroyoğun bakım ünitelerinde giderek artan klinik kullanımlarına rağmen PtiO₂ verilerinin doğru patofizyolojik yorumu konusunda çelişkiler mevcuttur (45). Son yıllarda Xenon-BT kullanılarak yapılan SKA ölçümlerinde ise PtiO₂'nin SKA ile korele olduğu açıkça gösterilmiştir (46, 47). Jaeger ve ark. geliştirdikleri termal difüzyon mikroproblarıyla lokal SKA'nın yatak başında sürekli ölçümünü yaparak SKA ve PtiO₂ arasındaki ilişkiyi ortaya koymuş, SKA'daki değişikliklerin %90'ında bununla eş zamanlı olarak PtiO₂'de de değişiklik olduğunu, dolayısı ile PtiO₂ düzeyinin esas olarak lokal SKA tarafından belirlendiğini saptamışlardır (45). Çalışmamızda SKA ile ilişkisi gösterilmiş olan PtiO₂ monitorizasyon sistemlerinden biri olan Licox'u kullanmayı tercih ettik. Diğer çalışmalarda Lazer Doppler kullanılmasına rağmen, lazer doppler ultrasonografi bölgesel SKA hakkında kesin sonuçlar vermediği, fakat fokal serebral iskeminin bölgesel SKA'da neden olduğu azalmayı ancak aynı denekte seri ölçümler yapıldığında saptayabildiği bilinmektedir (48). Üstelik bunun sağlanması için ölçümlerin daha önceden belirlenmiş anatomik noktalardan (bregmanın 2 mm posterioru ve orta hattın 6'şar mm her iki tarafından) yapılması

gerekmektedir. Doğru ölçümler için probun, ölçülmesi istenilen bölge ile doğrudan temas etmesinin sağlanması fakat akımı etkileyebileceğinden belirgin olarak görülen damarlardan uzağa yerleştirilmesi gerekmektedir; ödem formasyonu veya mikro kanamalarda hatalı ölçümlere neden olabilir (48, 49)

Serebral doku O_2 basınç sensörünün parenkim içerisinde nereye yerleştirilmesi gerektiği konusu hala tartışmalıdır (50). Çalışmalarda sensör kan elemanlarından etkilenebileceği için hematoma, kontüzyon alanları veya infarkt alanının içine yerleştirilmesi önerilmemektedir. Literatürde en fazla risk altındaki dokuyu incelemek için penumbra içine sensörü yerleştirmenin daha yararlı olduğunu savunan çalışmalar bulunduğu gibi, global beyin oksijenlenmesinin ölçülmesi ile tedavinin yönlendirilmesinin daha doğru olacağını savunanlar sensörün lokal kontüzyon alanlarından daha uzağa yerleştirilmesini daha uygun bulmaktadır (51).

Literatürdeki çalışmaların çoğunluğunda OSA'nın tıkanmasını takiben SKA'daki düşüş Doppler ultrasonografi ile değerlendirilmesine rağmen, çalışmamızda OSA'nın sulama alanına uyan beyin parankimine yerleştirdiğimiz O_2 basınç sensörü ile bu bölgedeki serebral doku O_2 basıncındaki değişiklikler saptandı. Ultrasonografinin uygulanabilmesi için burr hole açılmasını takiben duramaterin üzerinden ölçüm yapıldığından, O_2 basınç sensörünün yerleştirilmesi için yapılan cerrahi ek bir yük getirmemiştir (52). Böylece Doppler ultrasonografi ile yapılan ölçümlerde, ölçümü yapan kişinin tekniğine bağlı olarak ortaya çıkabilecek hatalı sonuçların engellenebileceğini düşündük.

Çalışmamızda, $PtiO_2$ sensörü sol OSA oklüzyonu sonrası beklenen SKA'daki düşüşü doğrulamak amacıyla, literatürdeki benzer çalışmalarda olduğu gibi sol orta fossaya temporal bölgeye yerleştirildi.

Çalışmamızda tüm OSA oklüzyonu uygulanan sıçan gruplarında $PtiO_2$ değerlerinde anlamlı düşüş saptandı. Hou ve ark.'larının EPR-oksometre kullanarak yaptıkları çalışmalarında $PtiO_2$ 'deki % 75'lik azalma anlamlı olarak kabul edilmiştir (53). Literatürde Licox kullanılarak sıçanlarla

yapılan çalışmalarda sıçanlar için belirlenmiş sınır değerler yoktur. Çalışmamızda grup 1 için %55.85, grup 2 için %34.17, grup 3 için %30.17, grup 4 için %23.63'lük $PtiO_2$ 'lük düşüşü oklüzyonun tüm gruplarda geliştiğinin belirtisi olarak kabul ettik. Gruplar arası karşılaştırma da ise anlamlı bir fark saptanılmaması çalışmamızdaki intraluminal filament yönteminin uniform olduğunu göstermiştir.

Geçici iskemik olaylarda iki ayrı patofizyolojik olay infarktın gelişmesine katkıda bulunur: *iskemik evrede* infarktın başlaması, *reperfüzyon evresinde* ise infarktın gerilemesi veya artması (reperfüzyon travması). Başlangıç evresinde, SKA'nın ileri derecede azaldığı bölgelerde oksijen ekstraksiyon fraksiyonunda artış olur. Deneysel çalışmalar reperfüzyon evresinden penumbral bölgedeki nöral yapıların en az zararlı kurtulabilmesinin; SKA'nın azalma süresine ve miktarına, fizyolojisi ve biyokimyası değişen beyin dokusunun canlılığını ne kadar koruyabildiğine bağlı olduğunu göstermektedir (1). Penumbanın iskemiyeye toleransı sadece perfüzyon bozukluğunun derecesine bağlı olmayıp süresinin de bir fonksiyonu sonucudur. Bu ilişkinin derecesi ve buna ek olarak iskemik bölgeyi genişleten ikincil mekanizmalar penumbrayı en ağır hasarın olduğu iskemik merkezinden perfüzyonun azaldığı periferdeki vasküler bölgelere kadar uzanmasına neden olan dinamik bir oluşum haline getirir. Bu durum tıkanan arterin tekrar kanalizasyonuna kadar geçen süre ne kadar kısa ise ve aynı zamanda rezidüel kan akımını fonksiyonlarını durdurarak sadece yaşamlarını sürdürebilme çabası için kullanan nöral doku kompartmanları için de faydalıdır. Bu yaşam sürdürebilme çabası "iskemik önkoşullama" kavramının başlangıç noktası olmuştur.

Literatürde önkoşullamanın kardiyoprotektif etkisi ile ilgili mekanizmalar araştırılırken, önkoşullamanın tetik faktörleri, mediyatörleri ve etkileme noktaları ortaya konmuştur. Bazı çalışmalar, ardkoşullamanın da sağladığı kardiyoproteksiyonun benzer yolları ve sinyalleri kullanabileceğini düşündürmektedir. Miyokard hasarının tedavisi ile ön ve ardkoşullamanın infarkt hacmini ve apoptozisi azalttığı gözlenmiştir (30, 54, 55, 56, 57). Buna karşın 1991'den beri yayınlanmış onlarca çalışmaya

rağmen serebral önkoşullama ve/veya iskemik toleransın nöral korunmadaki etki mekanizmaları hala yeterince açıklanamamıştır.

Klasik önkoşullamada değişik zaman dilimlerinde ortaya çıkan spesifik uyarana karşı verilen yanıtta adaptasyon söz konusudur (58). İskemik önkoşullamanın takip eden dönemde karşılaşılan iskemik hasarlara karşı koruma sağladığı Kato ve ark.'ları tarafından gösterilmiştir ancak iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinin önkoşullama ile sonradan gelen hasarlanma arasındaki sürenin günler sonra olduğu sanılırken Perez-Pinzon ve ark'ları 30 dakika gibi kısa bir sürenin bile korunma mekanizması oluşumu için yeterli olduğunu göstermiştir (11). Çalışmamızın neticeleri, 10 dakikalık önkoşullamayı takiben 24 saat sonra 2 saat süren oklüzyon sonrası reperfüzyon uygulamanın serebral infarkt hacmini literatürle uyumlu olarak azalttığını gösterdi.

Staat ve ark.'ları koroner anjiyoplasti ve stent takılmasını takiben gerçekleşen ardkoşullamanın akut miyokard infarktı sırasında kalpteki infarkt hacmini koruduğunu göstermişlerdir (59). Benzer etkinin beyinde de olabileceği yakın dönemde yapılmış birkaç çalışmada gösterilmiştir (25, 31, 36).

Ardkoşullamanın modifiye bir reperfüzyon olduğu ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı serebral dokuyu koruduğu gösterilmiştir (31). İskemik önkoşullama klinik olarak geniş kullanım olanakları olan bir fenomen olmakla beraber iskemik toleransın altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Toleranstan sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar arasında adenosin A1 ve A2 reseptörlerinin aktivasyonu, HSP 70/72, Bcl-2, SOD sentezi, ve apoptoz inhibitörleri sayılabilir (1, 60, 61). Çalışmamız iskemik toleransın moleküler mekanizmasıyla ilgili olmamakla beraber ardkoşullamanın iskemik toleranstaki yerini bir kez daha doğrulamıştır.

İskemik toleransın oluşumunda en az 3 protein sentez dalgası gereklidir. İlk dalga iskemiden 4 saat sonra ortaya çıkan baskılanmış protein sentezinin toparlandığı ama etkili korumanın sağlanamadığı süreç olup bu sırada, SOD ve katalaz gibi endojen antioksidan enzim sentezi

gerçekleşir (61). İkinci dalga önkoşullamadan 2 gün sonra ortaya çıkar; HSP 72'nin gecikmiş sentezi ile karakterizedir (62). Ardkoşullamayla uyarılan 3. dalga 2. dalgayla birleştiğinde tam tolerans gelişimiyle sonuçlanır. İlk iki dalga sırasında görülen koruyucu protein sentezi, ilk patofizyolojik stressin gen ekspresyonundan protein sentezine geçişi uyarması sonucu olurken ardkoşullama sonrası gerçekleşen protein sentezinin ilk iki sürece ilave olması kuvvetli ve uzun süreli nöroproteksiyonu sağlar (36). Burda ve ark.'ları sıçanlarda 4 damar oklüzyon modelinde ardkoşullamayı başarıyla uygulamışlar, başka modellerde de doğrulanmasını önermişlerdir (36). Bizde çalışmamızda benzer sonuçlara farklı bir modelle ulaştık.

Burda ve ark.'ları iskemik önkoşullama niteliğindeki 5 dakikalık iskeminin hipokampusta HSP 72'nin artmış üretimini, Danielisova ve ark.'ları ise iskemiden 5 dakika sonra ve 5 saatlik reperfüzyon sonrası SOD ve katalaz aktivitesinde anlamlı artışı gözlemişlerdir (61, 62). Burda ve ark.'ları iskemi sonrası artmış endojen antioksidan enzim aktivitesinin hipokampusun CA1 bölgesindeki nöronları gecikmiş nöronal ölümden korumaya yetmediğini 5 dakikalık iskeminin 2 gün sonra uygulanan 20 dakikalık iske miyle beraber bu nöronların %95'ini koruduğunu göstermiştir (63). Benzer şekilde Danielisova ve ark.'ları da ardkoşullama ile iskemiden iki gün sonra CA1 nöronlarındaki hasarın geri döndürülebilir olduğunu saptamışlardır (61).

Önkoşullama ve ardkoşullamanın neden olduğu gen ve molekül düzeyindeki değişiklikler pek çok modelle gösterilmesine rağmen birbirleriyle ilişkilendirildikleri bir sonuç henüz elde edilememiştir (64).

Bilateral kommon karotid arter oklüzyonu uygulanarak çalışmamızla aynı zamanda yapılan diğer bir çalışmada da Zhao ve ark.'ları iskemik ardkoşullamanın fokal serebral iskemi sonrası infark hacmini küçülttüğünü saptamışlardır (31). Bu da farklı yöntemler uygulansa dahi ardkoşullamanın serebral reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir.

Zhao ve ark. strok'un ciddiyeti ile bağlantılı olarak ardkoşullamanın penumbra apopitozu ve serbest radikal üretimini azaltarak iskemi sonrası infarkt büyüklüğünü azalttığını göstermişlerdir (31). Çalışmamızda önkoşullama, ardkoşullama ve ön-ardkoşullama uygulanan gruplarda infarkt hacminin OSA oklüzyonu uygulanan gruba göre azaldığı saptandı. Fakat önkoşullama, ardkoşullama ve ön/ardkoşullama ayrı ayrı veya birlikte uygulanmalarının, infarkt hacmi üzerinde anlamlı fark yaratmadığı izlendi. Klinik pratikte subaraknoid kanamalı olgularda operasyondan bir gün önce yapılan serebral anjiyografinin serebral vasküler yapılarda geçici bir süre oklüzyona neden olarak önkoşullama etkisi yaratabileceği ancak ameliyat öncesi önkoşullama uygulanamayan olgularda anevrizma operasyonu sırasında geçici klibin aralıklarla açılıp kapatılarak uygulanacak ardkoşullamanın dahi postoperatif dönemde gelişecek reperfüzyon hasarını azaltabileceği düşünüldü.

OSA oklüzyonundan 2 saat sonra başlattığımız 3x30sn'lik ardkoşullama süreci birbiri ardına uygulandığından, aslında her 30sn'lik oklüzyon bir sonraki 30sn'lik oklüzyonun önkoşullamasına denk gelmektedir. Böylelikle bir önceki önkoşullama sürecinde tetiklenen koruyucu etkinin bir sonraki devrede daha da güçleneceği düşünülebilir. Bu etki infarkt alan ölçümlerinde de izlenildi. Gerek önkoşullama, gerek ardkoşullama, gerekse ön/ardkoşullama gruplarında infarkt hacim ölçümlerinde anlamlı azalma saptandı.

Strok sonrası reperfüzyon serebral hasarda kritik bir rol oynar. Serebral iskemik önkoşullama strok'a karşı koruyucudur. Nöroşirurji pratiğinde anevrizma operasyonu sırasında geçici klip konulması gerektiğinde ardkoşullama yapılması spazm sonrası gelişebilecek iskemiden koruyabilir.

KAYNAKLAR

1. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(6):437-48.
2. Schurr A, Reid KH, Tseng MT, West C, Rigor BM. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res* 1986; 28;374(2):244-8.
3. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-36.
4. Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 1991;561(2):203-11.
5. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 1283-96.
6. Sapolsky RM. Cellular defenses against excitotoxic insults. *J Neurochem* 2001;76(6):1601-11.
7. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990;528(1):21-4.
8. Dowden J, Corbett D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures. *Stroke* 1999;30(6):1240-6.
9. Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Kikuchi H. Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain. *Brain Res* 1998;784(1-2):239-49.
10. Ferriero DM. Protecting neurons. *Epilepsia* 2005;46 Suppl 7:45-51.
11. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 175-82.
12. Davis DP, Patel PM. Ischemic preconditioning in the brain. *Curr Opin Anaesthesiol* 2003;16(5):447-52.
13. Garnier P, Ying W, Swanson RA. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Neurosci* 2003; 23(22):7967-73.
14. Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16(6):1137-42.
15. Vlasov TD, Korzhevskii DE, Polyakova EA. Ischemic preconditioning of the rat brain as a method of endothelial protection from ischemic/reperfusion injury. *Neurosci Behav Physiol* 2005;35(6):567-72.
16. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26(5):248-54.
17. Endres M, Gertz K, Lindauer U, et al. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol* 2003;54(5):582-90.

18. Kariko K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(11):1288-304.
19. Dawson VL, Dawson TM. Neuronal ischaemic preconditioning *Trends Pharmacol Sci* 2000 ;21(11):423-4
20. Wingrove JA, O'Farrell PH. Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* 1999 ;98(1):105-14.
21. Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(3):271-9.
22. Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, et al. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 2002 Jul;33(7):1889-98.
23. Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, et al. Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 2003 ;362(9389):1028-37.
24. Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, et al. Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(2):212-23.
25. Tang Y, Pacary E, Fréret T, et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult Mouse: Identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiology of Disease* 2006; 21: 18-28.
26. Dawson DA, Furuya K, Gotoh J, Nakao Y, Hallenbeck JM. Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19(6):616-23.
27. Bastide M, Gele P, Petrault O, et al. Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(4):399-405.
28. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000;54(11):2089-94.
29. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al. MRI in Acute Stroke Study Group of the German Competence Network Stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 2004; 35(3):616-21.
30. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion- induced injury *Cardiovascular Research* 2006; 70(2):200-11.

31. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26(9):1114-21.
32. De Georgia MA, Deogaonkar A. Multimodal monitoring in the neurological intensive care unit. *Neurologist* 2005; 11:45-54.
33. Hoelper BM, Alessandri B, Heimann A, Behr R, Kempfski O. Brain oxygen monitoring: in-vitro accuracy, long-term drift and response-time of Licox and Neurotrend sensors. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147(7): 767-74.
34. Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke* 2004; 35(2): 578-83.
35. Nakajima R, Nakamura T, Miyakawa H, Kudo Y. Effects of mannitol on ischemia-induced degeneration in rat hippocampus. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 341-48.
36. Burda J, Danielisová V, Némethová M, et al. Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2006, Epub ahead of print.
37. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22(4):393-403.
38. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H. Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique. *Acta Neurochir (Wien)* 1991;109(3-4):126-32.
39. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(3): 472-6.
40. Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 13:11-17.
41. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77:169-184.
42. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *JPN J Stroke* 1986; 8: 1-8.
43. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
44. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 1998; 29: 2162-70.

45. Jaeger M, Soehle M, Schuhmann MU, Winkler D, Meixensberger J. Correlation of continuously monitored regional cerebral blood flow and brain tissue oxygen. *Acta Neurochir (Wien)* 2005 ;147(1):51-6.
46. Menzel M, Doppenberg EM, Zauner A, et al. Cerebral oxygenation in patients after severe head injury: monitoring and effects of arterial hyperoxia on cerebral blood flow, metabolism and intracranial pressure. *J Neurosurg Anesthesiol* 1999;11(4):240-51.
47. Valadka AB, Hlatky R, Furuya Y, Robertson CS. Brain tissue PO₂: correlation with cerebral blood flow. *Acta Neurochir Suppl* 2002; 81:299-301.
48. Bolognese P, Miller JI, Heger IM, Milhorat TH. Laser-Doppler flowmetry in neurosurgery. *J Neurosurg Anesthesiol* 1993; 5:151-8.
49. Brauer P, Kochs E, Werner C, et al. Correlation of transcranial Doppler sonography mean flow velocity with cerebral blood flow in patients with intracranial pathology. *J Neurosurg Anesthesiol* 1998; 10:80-85.
50. Sarrafzadeh AS, Kiening KL, Bardt TF, Schneider GH, Unterberg AW, Lanksch WR. Cerebral oxygenation in contusioned vs. nonlesioned brain tissue: monitoring of PtiO₂ with Licox and Paratrend. *Acta Neurochir Suppl.* 1998;71:186-9.
51. van den Brink WA, van Santbrink H, Steyerberg EW, et al. Brain oxygen tension in severe head injury. *Neurosurgery* 2000; 46:868-76.
52. Curry WT, Sethi MK, Ogilvy CS, Carter BS. Factors associated with outcome after hemicraniectomy for large middle cerebral artery territory infarction *Neurosurgery* 2005; 56: 681-92.
53. Hou H, Grinberg OY, Grinberg SA, Demidenko E, Swartz HM. Cerebral tissue oxygenation in reversible focal ischemia in rats: multi-site EPR oximetry measurements. *Physiol Meas* 2005;26(1):131-41.
54. Kin H, Lofye MT, Amerson BS, et al. Cardioprotection by 'postconditioning' is mediated by increased retention of endogenous intravascular adenosin and activation of A2a receptors during reperfusion. *Circulation* 2004; 110:111-68.
55. Kin H, Zatta AJ, Jiang R, et al. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by Postconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 827.
56. Wang HC, Zhang HF, Guo WY, et al. Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation. *Apoptosis* 2006;11(8):1453-60.
57. Fantinelli JC, Mosca SM. Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Mol Cell Biochem* 2006 Epub ahead of print.
58. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* 2002;277(42):39728-38.
59. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112(14):2143-8.

60. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11(2):299-307.
61. Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* 2005;30(4):559-65.
62. Burda J, Hrehorovska M, Bonilla LG, et al. Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 2003; 28(8):1213-9.
63. Burda J, Matiasova M, Gottlieb M, et al. Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* 2005;30(11):1397-405.
64. Simkhovich BZ, Marjoram P, Poizat C, Kedes L, Kloner RA. Brief episode of ischemia activates protective genetic program in rat heart: a gene chip study. *Cardiovasc Res* 2003;59(2):450-9.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her türlü desteği veren Prof. Dr. E. Korfalı'ya, deneysel modeli öğrenmeme yardımcı olan Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. K. Türeyen'e, istatistiksel çalışmalarda yardımını aldığım Gökhan Ocakoęlu'na, deneysel aşamalarımın gerçekleşmesinde zamanımın büyük kısmını geçirdiğim Fizyoloji bölümünü evim gibi hissetmeme olanak sağlayan Prof. Dr. K. Özlük ve tüm Fizyoloji bölümü çalışanlarına, ve en önemlisi kendisine çalışmamın her aşamasındaki içten ve sonsuz desteğinden ötürü minnet borçlu olduğum Doç Dr. T. Alkan'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1974 Ankara doğumluyum. Giresun Cumhuriyet İlkokulu'nu bitirdikten sonra ortaokul ve lise öğrenimimi 1992 yılında TED Ankara Koleji'nde tamamladım. 1998 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 2000 Eylül TUS Sınavı sonucu ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım. Evliyim. İngilizce biliyorum.