

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ A.D**

**HOMOLOG KAN EMBOLİSİ KULLANILARAK SEREBRAL HİPOKSİ
OLUŞTURULAN TAVŞANLARDA; THYROTROPIN-RELEASING
HORMON'UN SEREBRAL İNFARKT VOLÜMLERİ,
SERUM INTERLÖKİN-1 VE BEYİN OMURİLİK SIVISINDA
LAKTAT, MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
ARŞ.GÖR.DR.ONUR ÇİÇEK**

**DANIŞMAN
PROF.DR.ERTUĞ ÖZKAL**

KONYA 2006

İÇİNDEKİLER

1-GİRİŞ	3
2-GENEL BİLGİLER	4
2-1 Tanım.....	4
2-2 Etyoloji.....	5
2-3 Serebral kan akımı ve enerji metabolizması.....	6
2-4 İskemi fizyopatolojisi.....	7
2-5 Serebral iskemide eksitatör aminoasitler.....	10
2-6 Serebral iskemide asidoz.....	12
2-7 Kalsiyum.....	12
2-8 Serbest radikaller.....	13
2-9 Kan beyin bariyeri değişiklikleri.....	17
2-10 TRH.....	17
2-11 İnterlökin.....	18
3-MATERYAL VE METOD	19
3-1 Operasyon.....	19
3-2 Biyokimyasal çalışmalar.....	21
3-3 Histopatolojik çalışmalar.....	22
4-BULGULAR	23
4-1 İstatistiksel çalışmalar.....	23
5-TARTIŞMA	27
6-SONUÇ	31
6 ÖZET	32
7-SUMMARY	33
8-KAYNAKLAR	34
9-TEŞEKKÜR	39

KISALTMALAR

AMPA	:Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazopropiyonik asid
ATP	:Adenozin Trifosfat
H⁺	:Hidrojen İyonu
H₂ O₂	:Hidrojen Peroksit
K⁺	:Potasyum İyonu
MDA	:Malondialdehit
NMDA	:N-Metil D-Aspartat
NADH	:Nikotinamid adenin nükleotid
NADH₂	:Nikotinamid adenin dinükleotid
SKA	:Serebral kan akımı
SPB	:Serebral perfüzyon basıncının
SVR	:Serebral vasküler rezistans
Na	:Sodyum
Cl⁻	:Klor
Ca⁺²	:Kalsiyum
BOS	:Beyin omurilik sıvısı
mg.	:Miligram
mV	:Milivolt
ml	:Mililitre
IL	:İnterlökin
ILα	:İnterlökin alfa
ILβ	:İnterlökin beta
ILγ	:İnterlökin gamma
TNFα	:Tümör nekroz faktör alfa
TBA	:Tiobarbütrik asit
TKA	:Trikloroasetik asit
TRH	:Thyrotropin-releasing hormon
TSH	:Thyroid-stimulant hormon
XO	:Ksantin oksidaz

GİRİŞ

İskemik inme, insanlarda genellikle tek bir intrakranial arterin tıkanarak tam veya kısmi fokal serebral iskemi oluşmasına bağlı olarak gelişen klinik durumdur(1). Serebrovasküler hastalıklar gelişmiş ülkelerde kalp hastalıkları ve kanserden sonra gelen üçüncü ölüm nedeni ve birinci sakatlık nedeni olması dışında, hastane başvurularında ve sağlık harcamalarında önemli bir yer tutan sosyoekonomik açıdan çok önemli bir hastalık grubudur(2). Durum böyle olunca bu hastalıklar artık geçmişte olduğu gibi sadece konu ile ilgilenen uzmanları değil tüm doktorları yakından ilgilendiren bir konu haline gelmiştir. İskemik inme bebeklikten ileri yaşlara kadar hayatın her döneminde görülebilir. Ancak yaş ilerledikçe iskemik inme oranı artmaktadır(3).

En sık görüldüğü ileri yaş grubunda insidans ve prevalansı da giderek artmakta ve bu durum klinik ve temel tıptaki bir çok bilim dalının konuya odaklaşmasını zorunlu kılmaktadır(2, 3). Hedef bu hastalıkların değiştirilebilir risk faktörlerin limitleri ile birlikte belirlemek, hastalık ortaya çıktıktan sonra da en uygun tedavi protokolleri ile akut kronik dönemde morbidite ve mortaliteyi minimuma indirmektir(2).

Özellikle son birkaç dekada iskemik dokunun sellüler ve moleküler yapısı ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı hızla gelişen nörogörüntüleme yöntemleri ile de belirgin bir biçimde artmıştır. Bu hızlı gelişmelere paralel olarak bu hastalıkların tanı ve tedavi algoritmaları da çok sık değişmektedir. Özellikle tedavi protokollerinin oluşmasını sayıları oldukça fazla olan merkezli çalışmaların sonuçları etkilemektedir(1- 3).

GENEL BİLGİLER

1 Tanım

Serebral iskemi, beyin kan akımında azalma ve normal beynin metabolik fonksiyonlarına yeterli gelmeyen kan dolaşımını ifade etmektedir. Beyin, iskemik toleransı sınırlı olan bir dokudur. İnsan beyinde bir damar tıkanıdığı zaman, sınırlı bir bölgede kan akımı kritik seviyenin altına düşer ve doku nekroza gider. Bu alan “iskemik çekirdek” olarak adlandırılır(1, 2). İskemik çekirdeği çevreleyen bölgelerde, perifere doğru gittikçe artış gösteren ve kollateral damar sistemleri tarafından beslenen farklı kan akım kuşakları mevcuttur. İskemik stres altındaki bu alanda henüz enfarkt meydana gelmemiştir. Ancak eğer iskemik durum düzeltilmez ise, bu bölgelerin zaman içerisinde nekroza gitme potansiyeli vardır. Kan akımının azaldığı ancak hasarın henüz oluşmadığı beyin bölgesine “kurtarılabılır doku” adı verilir ve bu doku günümüz tedavi yaklaşımlarının temel hedefini oluşturur(2, 4, 5).

Beyin kan akımının azalması veya kesilmesi tüm serebral alanları etkilemişse “global iskemi”, sadece bir bölge etkilenmişse “fokal serebral iskemi” terimleri kullanılmaktadır(2, 5). Serebral iskemi, serebral kan akımının derecesine göre de isimlendirilebilmektedir. Bu anlamda inkomplet serebral iskemide serebral kan akımı tam olarak kesilmemiştir ve bu durum hipoksi ile seyretmektedir. Komplet iskemide ise beyin kan akımı tam olarak kesilmiştir ve anoksi gelişmiştir. Diğer önemli bir faktör ise iskeminin kalıcılığıdır. Kısa süreli global iskemi sadece hassas nöronları etkilemektedir. Eğer iskeminin süresi uzarsa daha fazla sayıda hücre ve hücre tipleri etkilenmektedir (2,4).

2 Etiyoloji (4)

- a)Arteriosklerotik tromboz
- b)Geçici iskemik atak
- c)Emboli
- d)Rüptüre veya rüptüre olmamış sakküler anevrizma veya arterio-venöz malformasyon(AVM)

e)Arteritisler

I- Meningovasküler sifiliz, pyojenik veya tuberküloz menenjitinden sonra gelişen arteritis, postenfeksiyöz arteritler(Tifüs, schistomiasis, sıtma, trichinosis v.s.)

II-Konnektif doku hastalıkları(Poliarteritis Nodosa , Lupus Eritematozus), Nekrotizan Arterit, Takayasu Hastalığı

f)Serebral tromboemboli: Yüz ve sinüs enfeksiyonlarının komplikasyon olarak, menejit ve subdural ampiyem sonrası, postopratif ve postpartum tromboemboli.

g)Hematolojik hastalıklar:Polisitemi, sickle-cellanemi, trombotik trombositopenik purpura, trombositoz.

h)Karotid arter travması.

ı)Dissekan aort anevrizması.

i)Arteryel stenozla birlikte sistemik hipotansiyon: Akut kan kaybı, myokard infarktüsü, Stokes-Adams sendromu, travmatik veya cerrahi şok, sürekli postural hipotansiyon, sensitif karotid sinüs.

j)Arteriografi komplikasyonları.

k)Tentorial, foramen magnum ve subfalsiyal herniasyonlar.

l)Diğer hastalıklar grubu:

I-Fibromusküler displazi, radyoaktiviteye maruz kalma, kapalı kafa travmalarında orta serebral arter infarktüsü, sakküler anevrizmanın lokal basısı.

II-Oral kontraseptiflerin komplikasyonu, karotid arter veya orta serebral arterin disseksiyonu

m)Çocukların ve genç erişkinlerin bazı hastalıkları:

I- Moya moya hastalığı

II-Multipl progressif intrakranial arteryel oklüzyon

3 Serebral kan akımı ve enerji metabolizması

Beynin beslenmesindeki en önemli etken serebral kan akımıdır. Serebral kan akımı, serebral perfüzyon basıncının serebral vasküler rezistansa oranıyla belirlenir(5).

$$SKA=SPB/SVR$$

Nöronal doku ve hücrelerin beslenmesi için gerekli olan SPB, kanı serebral sirkülasyona yollayan arteriyel basınç ile venöz dönüş basıncı arasındaki fark belirler. Ortalama SPB, yatar pozisyondaki bir kişinin beyin tabanındaki ortalama arter basıncına eşittir ki bu değer; diyastolik kan basıncı ile (yaklaşık 80 mm/Hg) nabız basıncının üçte birinin toplamının ($1/3 \times$ yaklaşık 40mm Hg), intrakranial venöz basınçtan (yaklaşık 10mm Hg) çıkarılmasıyla elde edilen yaklaşık (80-85 mm Hg) değerdir (6). Bu basınç, dolaşımdaki metabolik moleküllerin serebral dokuya geçişini sağlar. Normal koşullarda SPB sabittir. Fakat iskemik arteriyel kan basıncını veya serebral venöz dönüşü etkileyen durumlar perfüzyon basıncını değiştirebilir. Sistemik arteriyel kan basıncı belirli bir değer altına düştüğünde veya intrakranial basınç arttığında, beyinde global olarak SPB azalır (6). Serebral perfüzyon basıncının normal olduğu durumlarda, serebral kan akımındaki değişiklikler serebral vasküler rezistansdaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Serebral kan akımında değişikliğe neden olan ve serebral vasküler rezistansı belirleyen serebral arterin yarı çapının değişmesi, birçok faktörle meydana gelir. Bunlardan potasyum ve hidrojen iyonları damar lümenini etkileyip güçlü kimyasal vazodilatasyon yaparlar(5, 6). Parsiyel arteriyel karbondioksit basınç değişiklikleri serebral vazomotor etki gösterir ve artışı vazodilatasyona, düşmesi vazokonstriksiyona yol açar. Diğer bir güçlü serebral vasküler rezistans belirleyicisi de arteriyel oksijen içeriğidir. Parsiyel oksijen basıncındaki değişiklikler veya hematokrit oynamaları, oksijen taşınımı sabit kalacak şekilde serebral vasküler rezistansta kompensatuar değişikliklere neden olurlar(6).

Serebral kan akımındaki fonksiyona bağlı olan değişiklikler, bölgesel oksijen ve glikoz mekanizmaları ile ilişkilidir. Diğer taraftan beynin sensorimotor ve mental aktiviteleri serebral metabolizma ile yakından ilişkilidir. Öyle ki herhangi bir sebebe bağlı olarak görülen nörokimyasal bir bozukluk veya yetmezlik, hızlı bir şekilde nörolojik bozukluğa yol açmaktadır. Nöronlar ve glial hücreler, özel fonksiyonları sırasında çeşitli

kimyasal işlemlere uğrarlar(5). Sinir hücreleri devamlı olarak membran potansiyellerini korumak, transmitter sentezlemek ve depolamak, aksoplazma üretmek ve bozulan striktüel yapıları yenilemek zorunluluğundadırlar. Serebral dokudaki bütün bu karmaşık aktiviteler enerji gerektirmektedir. Bu nedenle serebral hücreler vücuttaki diğer organlara göre yüksek miktarda enerji ihtiyacı duymaktadır(5).

Serebral iskemide gelişen bazı nörofizyolojik değişiklikler günümüze değin tanımlanmıştır(7). Normal serebral kan akımı 45-60ml/100/dk 'dır. 100 gram'da 20-25ml/dk'lık bir seviyede normotermik hafif anestezi altındaki bir bireyde EEG aktivitesi değişmez. Bu seviyenin altında EEG aktivitesi dereceli olarak kaybolur. 15 ml'nin altında ise uyarılmış elektriksel kortikal cevap kaybolur. Beyin kan akımı 10-12 ml/100gr/dk olduğunda iyon hemostazı kaybolur, ani ve komplet olarak nöronal depolarizasyon görülür. Nöronlardan hücre dışı aralığına massif potasyum(K^+) iyonu geçişi olur, bununla beraber nöronların içine sodyum(Na^+) ve kalsiyum(Ca^{+2}) geçişi olur. Buna da osmotik olarak su tutulumu ve hücre şişmesi takip eder.(7)

4 İskemi fizyopatolojisi

İskemik araştırmaların temelinde hücre sel enerji yetersizliği yatmaktadır. Hücre nekrozu bozuk enerji metabolizmasına sekonder olarak gelişmektedir. ATP ve diğer nükleotit trifosfatların sentezinde yetersizlik mevcuttur (8).

Bu durumda :

- 1- Yeterli enerji kaynağı yokluğunda anaerobik glikoliz uyarılarak intraselüler ve ekstraselüler asidoz oluşmakta
- 2-Enerji yetersizliği iyon dengesini bozmakta ve hücrenin yapısal bütünlüğü bozulmaktadır(8).

Normal hücre membranı hem pasif hem de enerji gerektiren aktif transportla hücre içi ile dışı arasında bir iyon dengesi sağlar. Hücre membranındaki fizyolojik iyonların eşitsiz dağılımı sonucu 60 mV civarında bir membran potansiyeli (hücre içi negatif) oluşmaktadır. Bu olay direkt yada indirekt olarak ATP nin etkisiyle ters yönde iyon transportu sonucu oluşur(9). Membran depolarize olduğunda elektriksel güç ortadan kalkar ve konsantrasyon gradyanına göre iyon geçişi olur. Bu durumda Na^+ ve Ca^{+2}

hücre içine girerken K^+ hücre dışına çıkmakta ve Cl^- da bunu takiben hücre içine girmektedir. Depolarizasyon sonrası membran potansiyeli ATP yıkımı ile tekrar kurulur. Sağlanan enerji ve $3Na^+/2K^+$ adenozin trifosfataz enzimi sayesinde 3 Na^+ iyonu dışarı atılırken 2 K^+ iyonu hücre içine girer, yine bir Ca^{+2} iyonu dışarı atılırken yerine iki H^+ iyonu hücre içine girer. $3Na^+/Ca^{+2}$ iyon değişimi hücre içinden Ca^{+2} iyonunun atılımını sağlar aynı anda Na^+/H^+ iyon pompasında H^+ iyonunun hücre dışına atılımını sağlar. Bu yolla Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının hücre dışı konsantrasyonunun hücre içi konsantrasyonundan 10 ila 10000 kat fazla olması sağlanmaktadır. Yine buna paralel olarak hücre içi K^+ konsantrasyonu da hücre dışı seviyesinden 40 kat daha fazladır(9).

İskemi esnasında iyon akışı iki fazda incelenebilir. Birinci fazda ekstraselüler K^+ iyonu yavaş bir şekilde yükselir. Ekstraselüler pH düşer, çünkü H^+ iyonu katyon kanallarından hücre dışına çıkarken, non-iyonik diffüzyonla laktik asit de hücreyi terkeder. Hücre dışında CO_2 birikimi de ekstraselüler ortamı asidik hale getirir. İkinci fazda K^+ iyonu hızla hücreyi terkederken Na^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonların hücre içine girer(10).

Bu iyon akışı iki tip hasar oluşturmaktadır. Birincisinde hücre içine Na^+ ve Cl^- girişi esnasında suyun da bu iyonlara eşlik etmesiyle hücre şişmesi olur (osmotik hasar). İkinci olarak hücre içine Ca^{+2} girişi sonucu hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış ve buna bağlı gelişen hasardır. Hücre içi depolardan hücre içine salınan Ca^{+2} da hücre membranının iyonlara geçirgenliğinin artmasına yol açar(10, 11).

Yüksek enerjili fosfatlar, makromoleküller ve makromoleküllerin bir araya gelmesiyle oluşan yapıların oluşumunda mutlaka gereklidir. ATP yetersizliği mikrofilamanlar ve mikrotubuller gibi hücre iskeletini sağlayan yapılarla hücre membranını oluşturan moleküllerde yıkıma yol açar. ATP yetersizliği sonucu oluşan bir diğer olay da fosfolipidlerin yıkılarak lipofosfolipitler, diasilgliseridler ve serbest yağ asitleri (araşidonik asit) gibi yıkım ürünlerinin birikmesidir. Bu yıkım enzimlerinin çoğu ATP yetersizliğinde Ca^{+2} iyonu tarafından aktive edilir (9, 10, 12).

Perifokal alanda yer alan ve elektriksel olarak inaktif ancak hala canlılığını sürdüren hücreler iskemik penumbra konseptinin oluşumunu sağlamıştır(10, 13).

Farmakolojik olarak penumbra alanı infarkt alanının potansiyel olarak canlılığını tekrar kazanabilecek bir parçası olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler elektriksel olarak sessiz de olsalar, enerji ve iyon dengelerini korumaktadırlar. Fakat kolayca harap olabilirler, çünkü yetersiz olarak kan alırlar ve aynı zamanda da ölmekte olan hücrelerle komşuluk halindedirler. İskemi zamanı uzadıkça penumbra alanı da infarkt alanına eklenmekte ve böylece infarkt alanı genişlemektedir. Buna ek olarak kritik periyotta ölen hücrelerden kaynaklanan bir takım maddeler penumbra alanında yer alan hücrelerde harabiyete yol açmaktadır. Bu maddelerin en önemlileri eksitator aminoasitler ve serbest radikallerdir. Penumbra alanın canlılığı, erken zamanda reperfüzyon sağlanarak veya infarkt sonucu ortaya çıkan toksik ürünlerin etkisini farmakolojik ilaçlarla ortadan kaldırarak devam ettirilebilmektedir. Bu ajanlar kritik periyot boyunca hücreye destek olmaktadır(10, 14).

Ancak bu olay optimal şartlarda özellikle de hemodilüsyonun sağlanarak reperfüzyon basıncının damar tıkanmasından önceki değere yükseltildiğinde ve kapillerlerdeki tıkanıklık açılabilirdiğinde olmakta, sıradan bir global iskemide çok kısa bir süre içinde reperfüzyon sağlanmadığında sonraki dönemlerde reperfüzyon sağlansa bile kalıcı hasar gerilememektedir. Çok erken sağlanan bir reperfüzyonda tüm zarar gören alanda iyileşme gözlenirken daha geç reperfüzyonda sadece penumbra alanında iyileşme gözlenmekte ve infarkt fokusunda iyileşme olmamaktadır(10, 14)

Reperfüzyon iki tarafı keskin bir kılıç gibi etki göstermektedir. Reperfüzyon ile iskemik dokularda yeniden canlanma sağlanırken bazı dokularda da "reperfüzyon hasarı" denen hasarlar görülmektedir(15). Bu hasar tekrar suyun ve osmotik iyonların bölgeye gelmesiyle tetiklenen ödem artışına bağlı olabildiği gibi yine tekrar sağlanan oksijenin yaralanmış dokularda serbest radikal oluşumunu tetiklemesine bağlı da olabileceği düşünülmektedir(16, 17).

5 Serebral iskemide eksitatör aminoasitler

1957 yılında Lucas ve Newhouse isimli araştırmacılar eksitatör aminoasit toksisitesinden bahsetmişlerdir(18). Bu otörler retinal distrofiyi iyileştirmek için çeşitli maddeler denerlerken glutamatın sistemik enjeksiyonunun fare retinasının iç sinir katmanlarını harapladığını gözlemlemişlerdir. 1969 ve 1971 yıllarında da Olney ve Sharpe'in çalışmaları sonradan eksitotoksisite olarak adlandırılacak bu nörotoksik etkinin yalnızca glutamat ve retinal nöronlara özgü olmadığını, eksitatör aminoasitlerin belli koşullar altında santral nöronlar üzerinde genel etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır(19). Bu bulgulardan yola çıkılarak nöron hücrelerinin kaybıyla giden pek çok nörolojik hastalığın nedeninin glutamat ve benzeri bileşikler olduğu iddia edilmiştir(19). Endojen glutamat birikiminin sağlandığı bir çok deneysel modelde ciddi nörolojik hastalıkların oluştuğu gösterilmiştir. Glutamat epileptik beyin hasarı, Huntington hastalığı, kafa travması, spinal travma ve beyin ödemi gibi hastalıkların fizyopatolojik mekanizmasının içinde yer almaktadır(14).

Bir çok eksitatör aminoasitten söz edilmekle birlikte üzerinde en çok durulan ikisi, birer dekarboksilik aminoasit olan glutamat ve aspartattır. Glutamat ve aspartatın memeli beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu (10 ve 4 mmol/l) bildirilmiştir(20). Bu aminoasitlerin nöronların yaşaması, sinaptogenez, nöronal plastisite (nöronun şeklini koruyabilmesi), öğrenme ve hafıza gibi pek çok temel fizyolojik sürece katkıları olduğu bildirilmektedir. Bunlara ek olarak santral sinir sisteminde sinaptik ileti L-glutamat üzerinden olmaktadır. Gerçekte glutamat tüm santral nöronları uyarabilir. Glutamatın etkisiyle nöron depolarize olur ve aksiyon potansiyeli ile nöron ağı içinde mesaj iletimi başlar. Eksitotoksik etkisi bu özelliğine bağlıdır; glutamat ve benzeri maddelerin sinir uyarıcı etkisi paradoksal bir fenomen olarak belli koşullarda nöron hücresinin ölümüyle sonuçlanacak nöropatolojik bir sürece dönüşebilir(20).

Eksitatör aminoasitlerin esas etkisini göstereceği postsinaptik membrana ulaşmasından önce, presinaptik membran ve glia hücresi bu aminoasitlerin salınımını ve presinaptik aralıktaki yoğunluğunu çeşitli yollarla kontrol eder. Bunlar arasında presinaptik membran reseptörleri ve glia hücresinin glutamatı sinaptik yarıktan geri alması sayılabilir(10, 14, 21, 22).

Glutamatın sinaptik yarıktaki çoğalması toksik etkilere yol açarken, onun yoğunluğunu düzenleyen mekanizmalar normal etkisini sürdürmesini sağlar. Glutamat yüksek potansiyelli ve hızlı etki gösteren bir nörotoksindir. Ancak *in vivo* etkisi yukarıda sözü edilen presinaptik membran ve glia hücrelerinde içinde olduğu normal hücrelerel geri alım mekanizmalarının varlığında ekstraselüler alandan hızla uzaklaştırılmasından ötürü maskelenir. Nitekim hücrelerel geri alım mekanizmalarının işlemediği bir hücre kültürü ortamında çok düşük dozlarda dahi ciddi nöronal hasar yarattığı bildirilmiştir(20, 21, 23).

AMPA reseptörleri monovalan katyonlar olan Na^+ , K^+ ve H^+ iyonlarının nonselektif olarak geçişini sağlar. Bu kanalların açılmasıyla Na^+ hücre içine girer ve depolarizasyon oluşur. NMDA reseptörüne göre daha kolay ve daha hızlı uyarılırlar, eksitator ağılarda enformasyonun hızlı iletiminden sorumludurlar. NMDA tip reseptörler ise hem monovalan katyonların hem de Ca^{+2} iyonunun hücre membranından geçişini sağlar. Yüksek güçte sinaptik giriş ile aktive olabilir ve uzun süreli bir depolarizasyon sağlar(10, 11, 14).

Depolarizasyon oluştuğunda Na^+ AMPA reseptörler kanalları yoluyla hücre içine girer ve bunuda NMDA kanalları yoluyla Ca^{+2} girişi takip eder. Na^+ ve Ca^{+2} un hücre içine girişi ile oluşan depolarizasyon L ve T tipleri yoluyla da hücre içine Ca^{+2} girişini sağlar(24).

Hücre içine giren ya da intraselüler depolardan salınan Ca^{+2} hücre içindeki bir takım moleküllerle tamponlanır yada organellerin içine depolanır. En önemli tampon yapılan kalmodulin ve kalsibindin isimli proteinlerdir(7, 25). Hücre içinde Ca^{+2} ve hidrojen aynı tampon bölgelerine bağlanmaktadır. Bu nedenle asidoz durumunda hücre içi serbest Ca^{+2} miktarı artmaktadır(24).

Nonfizyolojik uyarı ile hücre içinde Ca^{+2} aşırı birikmesi sonucu lipazlar, proteazlar ve endonükleazlardan oluşan enzimler yüksek oranda aktive olur. Yine protein kinazların aktivasyonu ile membran kanallarının ve reseptörlerinin fonksiyonları bozulur. Proteazların aktivasyonu ile hücre iskeletini oluşturan ve plazma membranının bütünlüğünü sağlayan yapılar yıkılır ve hücre ölüme doğru gider(24).

6 Serebral iskemide asidoz

İntraselüler asidoz postiskemik beyin hasarını arttıran önemli bir etkidir. İskemiye takiben hiperglisemi yapılmış çalışmalarda, aerobik metabolizma için yeterli oksijen yokluğunda laktik asit üretiminin arttığı ve iskeminin etkisinin ağırlaştığı gözlenmiştir(26).

Asidozun doku hasarını arttırması 4 mekanizmayla olmaktadır. Bunlar ödem oluşumu, mitokondrial solunumun inhibisyonu, laktat oksidasyonunun inhibisyonu ve hidrojenin hücreden atılımının inhibisyonudur(24). Asidoz sodyum hidrojen pompasını aktive ederek osmotik etkiyle hücre içine su girişini aktive eder, ayrıca mitokondriyi etkileyerek oksidatif fosforilasyonu azaltıcı etki gösterir. Asidoz iskemik periyotta biriken laktatı temizleyen enzimler gibi, bir çok enzimi deaktive eder. Diğer enzimlerin deaktivasyonu ile protein sentezi durur. Düşük intraselüler pH mitokondriyi etkileyerek ATP sentezini bloke eder(24).

7 Kalsiyum

Kalsiyum iyonu hücreler arası iletişimde önemli bir fonksiyona sahiptir. Normal seviyede intraselüler Ca^{+2} metabolik düzenlemede, nörotransmitter salınımında rol oynarken aynı zamanda hücre içinde ikinci mesajcı olarak da fonksiyon görür. Nöron içi Ca^{+2} dengesi normal santral sinir sisteminin fonksiyonu için hayati önem taşımaktadır. İskemi durumunda intraselüler depolardan salınım ve ekstraselüler alandan da hücre içine akım sonucu sitoplazma içi Ca^{+2} konsantrasyonunun yükselmesi, nöronun fonksiyonunu kaybetmesine yol açar(10, 25, 27).

1980'li yılların başında, hipoksi-iskemi hipoglisemi ve status epileptikusta hücre içi Ca^{+2} yükselmesi ve buna bağlı gelişen nöron ölümünün, dendritik membrandan kalsiyumun hücre içine girişinin sonucunda olduğu düşünülmektedir(10). Günümüzde bu hipotez hala geçerli olmakla birlikte Ca^{+2} un hücre içine asıl giriş yolunun glutamat ve diğer eksitator aminoasitlerin etkisiyle olduğu anlaşılmıştır(10). Ca^{+2} nedeniyle oluşan hücre ölümü hipotezi son zamanlarda Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalığı da kapsayacak şekilde genişletilmiş ve kalsiyuma "hücre ölümünün programlatıcısı" adı verilmiştir(10, 27- 29).

Hücre içinde normal durumlarda Ca^{+2} iyonu kalmodulin ve kalsibindin gibi proteinlerce bağlanarak tamponlanır. Ancak H^+ iyonu da aynı proteinlerle tamponlanmaktadır. Bu nedenle asidoz durumunda bu bağlayıcı proteinlerin daha büyük bir bölümü H^+ iyonunu tamponlamakta ve bu durumda da hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu artmaktadır(9, 14, 24, 25).

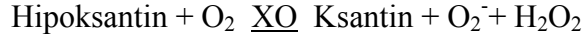
Kalsiyum iyonunun hücre içi aşırı miktarda artışı protein kinazları aktive eder ve reseptörlerle membran kanallarından iyon geçişi bozulur. Akut hücre hasarındaki anahtar etkilerden biri plazma membranını ve hücre iskeletini oluşturan maddelerin ve zincirlerin proteazlar tarafından yıkılmasıdır(11, 25). Bir diğer eşit önemde patolojik olay fosfolipazların aktivasyonudur; Ca^{+2} iyonunun enerji yetersizliği sonucu hücre içi konsantrasyonunun yükselmesi fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonuna yol açmakta ve sonuçta lipofosfolipidlerle, özellikle araşidonik asiti içeren serbest yağ asitlerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Fosfolipaz C ise diasilgliseridleri katalize ederek bir başka yoldan araşidonik asit ve inositoltrifosfat açığa çıkarır . Lipofosfolipidler ve serbest yağ asitleri özellikle de doymamış olanları membran üzerinde toksik etki oluşturur. Araşidonik asit de serbest radikallerin oluşumuna katkıda bulunmaktadır(11, 16).

8 Serbest radikaller

Bir atom yada molekül bir elektron alarak(indirgenme) ya da bir elektron vererek (oksidasyon) serbest radikal haline gelebilir(17).

Biyolojik sistemler normal koşullarda bünyelerindeki oksijenin çoğunluğunu tetravalan olarak indirgerler. Bunun içinde mitokondrial sitokrom oksidaz gibi etkin hücre içi sistemleri kullanılır. Biyolojik sistemlerin normalde pek az kullanıldığı ancak bazı durumlarda artan univalan indirgenme sonucu değişik reaktivite derecelerine sahip serbest radikaller ortaya çıkar. Bir, iki veya üç elektronun oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu sırasıyla süperoksit radikali (O^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil(OH^-) oluşur. H_2O_2 serbest radikal olmamakla birlikte hızla hidroksil radikaline dönüştüğünden serbest radikal olarak anılmıştır. Bu indirgenme mitokondrial solunum zincirinin ilk basamağında oluşur(17).

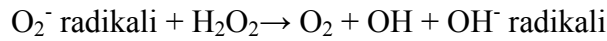
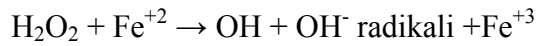
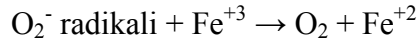
Ekstramitokodrial reaksiyonlarda ise hipoksantin ve ksantin, ksantin oksidaz tarafından okside edildikleri reaksiyonda serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaksiyon işlemi yeniden kanlanma esnasında serbest radikallerin başlıca oluşum şeklidir. Çünkü iskemi esnasında hipoksantin ve ksantin birikimi olmakta ve Ca^{+2} yükselmesi de ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren proteazları aktive etmektedir(24).



XO:Ksantin oksidaz

Hidroksil radikali son derece toksik bir yapıdır ve rastgele olarak komşu lipit protein ve DNA moleküllerine saldırır. Hidroksil radikali, oksijen radikali ve H_2O_2 nin oluşturduğu kimyasal reaksiyonda oluşur. Bu reaksiyona "Haber-Weiss reaksiyonu" adı verilmektedir(30). Bu reaksiyon doğal durumda çok yavaş olurken demir tarafından katalize edildiğinde hızlanmakta ve böylece hidroksil radikali oluşumu hızla artmaktadır (30).

Normalde ferritin ve transferin taşıyıcı proteinlerine sıkı şekilde bağlı olan Fe^{+3} oksijen radikali varlığında ferritinden, asidoz varlığında da transferinden ayrılır(16, 24, 30).



Serbest radikaller kimyasal olarak güçlü reaktif moleküllerdir. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyonu başlatırlar(17).

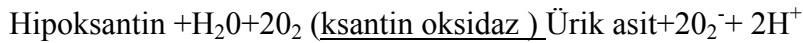
Serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir Birincisinde, lipidlerin peroksidasyonu ile hücre zarının geçirgenliği bozulur. İkincisinde ise oluşan serbest radikaller çevrelerindeki zincirleme reaksiyonun yayılmasıyla daha uzaklardaki biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar yaratırlar. Hedef biyolojik moleküller arasında, plazma membran, hücre organellerinde bulunan doymamış yağ asitleri, çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve çeşitli sentez ve genetik kod aktarımını yöneten nükleik asitler sayılabilir(16, 31).

Biyokimyasal ortam düzeyinde özetlenen tüm bu reaksiyonlar ikincil hasar olarak adlandırılan patolojik değişikliklerden sorumludurlar. İlk radikallerin oluşması sadece lokal etkilere neden olurken, zincirleme reaksiyonun ara ve son ürünleri daha uzak bölgelere yayılarak, vasküler geçirgenlikte artma, ödem, enflamasyon, kemotaksis ve ikincil iskemiye yol açarlar(31).

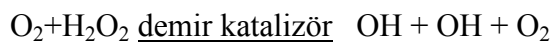
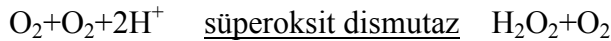
Reperfüzyonda serbest radikal üreten kaynaklar;

1. Mitokondrial elektron transport zincirinden oksijen kaçaklarının artması: Normal koşullarda METZ'de oksijenin kısmi indirgenmesi ile oluşan serbest radikallerin %1-5 olduğu belirtilmiştir. Reperfüzyonda gelen ani ve yüksek konsantrasyondaki moleküler oksijenin iskemi sırasında birikmiş indirgen eşdeğerler (NADH, NADH₂) ile kısmi indirgenmesi sonucunda radikal iletimi ve oksijen kaçağındaki fizyolojik oran artmaktadır(32).

2. Vasküler endotel kaynaklı ksantin oksidaz (XO) reaksiyonu: İskemi döneminde Ca⁺² bağımlı proteazlarca veya sülfidril gruplarının oksidasyonu ile ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşmesi sonucunda dokuda XO oranı % 10' luk fizyolojik oranın üzerine çıkmaktadır. Yine iskemide ATP'nin hidrolizi ile ortaya çıkan purin metabolitlerinden hipoksantin ve ksantin, XO için substrat oluşturmaktadır. Reperfüzyon ile moleküler oksijenin ani ve fazla miktarda dokuya girmesi sonucu ksantin oksidaz reaksiyonu ile ürik asid, yan ürün olarak da süperoksit anyon radikali (O₂⁻) oluşmaktadır(32).



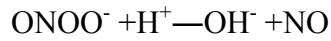
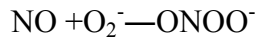
Oluşan süperoksit radikali H₂O₂ ve OH radikalini oluşturmaktadır.



3. Lökosit (nötrofil, lenfosit, monosit) aktivasyonu: İskemik bölgeye lökositlerin infiltrasyonu reperfüzyon hasarının önemli bir nedenidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, beyinde iskemik hücrelerin, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla yangısal yanıtı açan, kemotaksik maddeleri ve adhezyon molekül aktivatörlerini salgıladıkları gösterilmiştir(33). Nötrofiller, adhezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek (diapedez olayı) ekstravasküler dokuya doğru göç ederler. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), hipoklorik asit ($HOCl$) ve kloraminleri ($R'RNCI$) oluşturarak ileri doku hasarına neden olurlar(34).

4. Plazma ve organel membranlarından kaynaklanan araşidonik asit kaskadı: İskemi sırasında membran fosfolipidlerinin artmış lipolizi ile biriken araşidonik asidin reperfüzyonda hızlanmış metabolizması sonucu hidroperoksit prostaglandin G_2 , hidroperoksieikozotetraenoik asit ve prostaglandin H_2 oluşum basamaklarında süperoksit anyon radikali oluşmaktadır(29).

5. Nitrik oksit sentaz (NOS) aracılı serbest radikal oluşumu: Reperfüzyonda indüklenebilir NOS aktivasyonu ile nitrik oksit (NO) yapımı artmaktadır. NO'nin O_2^- ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitritin ($ONOO^-$) parçalanması ile ortaya hidroksil radikali (OH^-) çıkmaktadır(12).



9 Kan beyin bariyeri değişiklikleri

Hipoksi, beyin dokusunda mikrovasküler disfonksiyona neden olmaktadır. Beyin mikrovasküler yapısı esasen üç hücreden oluşmaktadır. Bunlar endotelial hücreler, perisitler ve astrosit foot proses'leridir(35). Perisitler, kan beyin bariyerinde basal membranı endotelial hücreler ile paylaşan hücrelerdir. Perisitler endotelial hücreler ile birlikte mikrovasküler yatağın stabilizasyonu ve devamlılığını sağlar mikrovasküler duvarda mekanik bir bariyer oluştururlar(30). Hipoksidede perisitlerde bir dizi reaksiyon meydana gelmektedir. Serebral iskeminin erken döneminde(ilk 2 saatte) perisit yüzeyinde migrasyona yardımcı olmak üzere spike'lar oluşmaktadır. İkinci olarak basal lamina kalınlaşmakta ve bu esnada endotel hücrelerinde bir değişiklik olmamaktadır. Serebral iskemide perisit migrasyonu olduğu ve bunun da kan beyin bariyerini bozarak iskemik hasara katkıda bulunduğunu göstermiştir(30).

10 Tiroid releasing hormon(TRH)

TRH ilk olarak hipotalamusta tespit edilmiştir. Hokfelt ve arkadaşları tarafından 1975 yılında TRH içeren nöronlar beyin ve spinal kordda yaygın olabileceği gösterilmiştir(36). Şu an için kabul olunan TRH bir nörotransmitter veya nöromodülatör olarak görev yapan endojen tripeptid(pGlu-His-PrNH₂) yapıda hipotalamik bir hormondur(37). TRH'nın en iyi açıklanmış fizyolojik rolü hipofiz bezinde TSH salgılanmasını sağlamaktır(38). TRH'nın santral etkilerinden bir kısmı kolinerjik mekanizma ile gerçekleşmektedir ve TRH potensleri asetilkolin ve kolinomimetiklerin neden olduğu sinir nekrozunu azaltır (39). Bazı yazarlar tarafından da TRH ve dopamin arasında pozitif etkiler tanımlanmıştır(38). TRH analogları dopamin mekanizma yolu ile de iskemik hasarı azalttığı tespit etmişlerdir(40). Ayrıca TRH otonomik opioidlerin etkilerini kısmen antogonize eden kısmi opioid antagonisttir . Somatik ve otonomik sistemlerin üzerine etkileri de içermektedir ve TRH etkilerinin bir çoğu onun analeptik özelliğinden kaynaklanmaktadır(41).

Santral sinir sistemi hasarlarında; iskemi veya travmatik etkilere karşı endojen TRH sistemi önemli bir savaşçı olabilir(42). Dikkatler yakın zamanlarda dejeneratif nörolojik durumlarda TRH'nın etkilerinden dolayı ilgi merkezi haline gelmiştir(43). Buna rağmen Metcalf 1982 yılında TRH'nın teropotik gücü in vivo olarak TRH'nın hızlı enzimatik yıkımı ile sınırlı olduğunu bildirmiştir(44). Sinir dokusu içinde TRH için spesifik reseptör sahaları tanımlanmış ve bu reseptörler otoradyografi ile beyin içerisinde

düzensiz dağılmış olduğu tespit edilmiştir. TRH reseptörleri fosfolipaz C ile pozitif olarak kenetlenmiştir, böylece inositol fosfat üretimini artırır ve protein kinaz C aktivasyonuna yol açar(45). TRH'nın nöroprotektif etkisinin protein kinaz C aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmüş. Protein kinaz C' yi inhibisyonuna neden olan bisindolilamidli ile yapılan çalışmada TRH'nın nöroprotektif etkisi anlamlı olarak engellenmiştir(45). Beyin hasarında TRH'nın tedavi edici etkilerinin olduğunu destekleyen çalışmalar arasında TRH'nın Glutamat bağımlı hücre kaybını inhibe ettiğini kanıtlayan çalışma sayılabilir. Fare hipokampal preparatlarında TRH' nın NMDA tarafından oluşturulan nörotoksisite de koruyucu olduğu bulunmuştur(45). Deneysel spinal travmada TRH'nın yararlı etkileri rapor edilmiştir(46). Faden ve arkadaşlarının yaptığı deneysel spinal kord travması çalışmasında intratekal 0,2mg/kg verilen TRH ile 2mg/kg verilen TRH'nın belirgin bir fark görülmezken naloksan ve yüksek doz kortikosteroid tedavisine göre daha iyi tedavi sağladığı görülmüştür(42).

11 İnterlökin

Stroku takiben ortaya çıkan serebral lezyonlarda artan şekilde inflamatuvar cevap önemli rol oynar. Lökositlerin erken dönemde iskemik alana inflamasyonu ve beyin ödemi iskeminin neden olduğu inflamasyonun karakteristik özelliğidir. Daha fazlası beyinin yerleşik hücreleri olan iskemik yaralanmayı takiben aktive olurlar. Bu inflamatuvar cevapların çoğunda da sitokinlerin multifonksiyonel alt sınıfı olan interlökinler tarafından meydana getirilir. Fizyolojik durumda sitokinlerin hareketleri oldukça yavaştır. Her nasılsa bu sitokinler beyin yaralanmasını takiben birden aktive olurlar ve iskemide bu olayın merkezinde IL1 bulunur(47).

IL1 ailesel olarak taşınan üç genin kodlandığı yüksek katmanlı üç adet farklı proteinden oluşur. IL1 α ve IL1 β reseptör üzerine yapışır ve intraseluler sinyali başlatır. Her nasılsa ailenin üçüncü üyesi ise IL1 reseptör antagonisti olan (IL1ra)dır. Buda aynı proteine yapışır ancak intraseluler sinyali başlatmaz. IL1ra gerçekte IL1 aktivitesini inhibe eder. IL1 β beyinde predominant formda çalınan en büyük formudur, bununla birlikte IL1 α ise membrana bağlı formudur(47).

Pek çok deneysel çalışmada IL1 β nın strokta artış gösterdiği görülmüştür(47)

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma 2006 yılında Selçuk Üniversitesi deney hayvanları laboratuvarında Nisan ve Temmuz ayları arasında yapıldı. Yapılan çalışmamızda 2 grup şeklinde toplam 20 adet, 2-3 kg ağırlığında tek cins (dişi) , Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı.

Operasyon

Tavşanların kulak veninden 1.5 ml kan alındı ve pıhtı oluşması için 3 saat oda sıcaklığında bekletildi. 3 saatlik sürenin sonunda oluşan pıhtının serumu tamamen atıldı, kalan kısım 21 no'lu enjektör iğnesinden geçirilerek inceltildi ve içinde 0.4 ml izotonik sodyum klorür solüsyonu bulunan enjektöre bu inceltilmiş pıhtıdan 0.4 ml çekildi. Bu yöntemle hazırlanan pıhtı parçalarının mikroskopik ölçümünde uzunluklarının 0.3-2 mm olduğu görüldü. Bu işlemler sonunda tavşanlar 35mg/kg I.M Ketamin HCL (Ketalar PARKE-DAVİS/Eczacıbaşı) ve 5mg/kg I.M.Ksilazin HCL (Rompun %2 BAYER) kullanılarak uyutuldu ve anestezi esnasında tavşanların vücut ısısı elektrik lambası ile korundu. Tavşanların herbirinin kulak veninden 1.5 ml kan ve sisterna magnasından 1,5ml BOS alındı. Saha temizliği sonrası tavşanların sağ ön servikal bölgesine yapılan vertikal bir insizyon yardımı ile sağ ana karotid arter ortaya çıkartıldı ve proksimalinden klipe edildi. Daha sonra ana karotid artere 21 no'lu intravasküler kateter sokularak karotis bifurkasyonuna kadar itildi. Bu kateter aracılığı ile hazırlanan pıhtı 2 dakikalık sürede karotis arter içine enjekte edildi. Pıhtının enjeksiyonu sonunda kateter çıkartıldı. Damar duvarındaki defekt spongostan (Curaspon®) yardımıyla kapatıldı. Gerekli hemostazın sağlanamadığı deneklerde 5-0 vicrly ile suture edilerek hemostaz sağlandı. Daha sonra ana karotid arterdeki klip kaldırılarak kan akımının tekrar başlaması sağlandı. 2.gruba embolizasyon işleminden 45 dakika sonra intratekal 0.2mg/kg TRH (TRH Ferring amp 0.2mg/ml Er-Kim) verildi.

Embolizasyondan sonra tavşanlar 24 saat yaşatıldı ve 24 saatin sonunda tekrar 1.5ml kan ve 1.5ml BOS örnekleri alındı. İntrakardiyak hava verilerek öldürüldü. Embolizasyon sonrası 24 saat yaşamayan denekler araştırmaya dahil edilmedi. Ölümünden hemen sonra tavşanların beyinleri çıkartılarak % 10'lik formaldehit solüsyonu içinde bir hafta bekletildi.



Resim 1: Cerrahide kullanılan malzemeler.



Resim 2: Tavşan sisterna magnasından BOS alınışı.



Resim 3: Tavşanlarda embolizasyon işlemi.

Biyokimyasal çalışmalar

Deneklerden alınan örnekler -70°C saklandı. 0.5 ml kanda IL1 β bakıldı. Alınan 1.5 ml BOS da MDA ve laktat incelendi.

a)Laktat tayini: Deneklerden alınan 1ml BOS; Kodak Vitros Ektachem 700XR cihazında spektrofotometrik metodla, aynı marka kit ile çalışma uygulandı.

b)MDA tayini: Çalışmada spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır ve çift kaynatma esasına dayanır. Birinci ısıtmada bağlı olan MDA proteinlerden serbestleştirilerek proteinler çöktürülür, ikinci ısıtmada ise toplam MDA, TBA ile tepkimeye girer. TBA-MDA'nın oluşturduğu renkli bileşimin absorbansı 532 nm'de ölçülerek MDA'nın molar absorpsiyon kat sayısından yararlanılarak seviyesi hesap edilir. Bu yöntemde de oluşabilecek hatalar ve etkileşimler en aza indirilmiştir. Deney tüplerine 2.5ml %10'luk trikloroasetikasit (TKA) çözeltisi kondu ve deneklerden alınan 0.5ml BOS eklendi. Tüpün ağzı kapatılıp 90°C deki su banyosunda 15dk bekletildi. Sonra çıkartılarak soğuk su altında soğutuldu ve 3000 devir/dk 'da 10 dk çevrildi. Üstteki kısımdan 2 ml başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine %0.675'lik TBA çözeltisinden 1 ml eklenerek ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra 90°C 'de su banyosuna konuldu ve 15 dk bekletildikten sonra soğuksu altında soğutuldu. Spektrofotometrede 532nm'de köre karşı numunenin absorbansı ölçüldü. MDA-TBA bileşiğinin 532 nm'deki katsayısından yararlanılarak nmol/ml cinsinden MDA değeri hesaplanılarak bulundu.

c:Yoğunluk A:Absorbans

$$c(\text{nmol/ml})=A \times 58.27$$

c) IL1 β tayini: Deney hayvanlarından elde ettiğimiz serumlarda IL1 β , sandviçleme esasına dayanan bir Enzyme Linkend Immuno Sorbent Assay(ELİSA) kiti (The BioSource International) kullanılarak ölçüldü. Çalışmada katı fazı IL1 β için spesifik antikorlarla kaplı 96'lık mikrotiter pleyt kullanıldı. İçerisinde IL1 β olduğu bilinen farklı dilüsyonlarda ki 8 standart , kontrol serumlar ve denek serumları kuyucuklara pipeplendi.

Birinci inkübasyon ile IL1 β molekülü ile katı fazda bulunan antikorların bağlanması sağlandı. Yıkama işleminin ardından bu kez Biotinilated ile işaretli antikorları içeren konjugat ilave edildi. ikinci inkübasyonla , birinci inkübasyon sonunda immobilize olmuş IL1 β 'nın Biotinilated ile işaretli antikorlarla birleşmesi sağlandı.

Yıkamanın ardından Streptavidin-HRT(yaban turpu peroksidazı) ilave edildi ve bağlanması için üçüncü inkübasyona geçildi. Son yıkamadan sonra Stabilize Kromojen ile renk oluşumu sağlandı ve stop solusyonun ilavesi ile okuma aşamasına getirildi. 450nm de ilk önce, standart değerleri için önceden belirlenmiş olan optik dansitede değerleri girilerek bir eğri oluşturuldu. Son olarak örnek kuyucuklarındaki IL1 β miktarları, optik dansitelerinin standart eğrisi ile karşılaştırılması ile elde edildi.

d) Histopatolojik çalışmalar:% 10 luk formalin solusyonu içerisinde 1 hafta bekletilen beyinler hemisferlerine ayrıldı. Her bir hemisfer, korpus kallozumun genu'sunun önü ile temporal polün önünden geçen bir kesi ve sulkus parietooccipitallisten geçen ikinci bir kesi ile ön-orta ve arka olmak üzere üç bölüme ayrıldı. Ayrıştırılan dokuların tamamı doku takip cihazına alındı. Yaklaşık 1 gün süren bu işlem sonunda dokular parafin bloklara gömüldü ve her bloktan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eosin ile boyandı. Hazırlanan preparatlar BAB Bs 200 ProB Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi desteği ile ışık mikroskopunda incelendi. enfark hacimlerini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$V= a \times k$$

$$V=\text{hacim}(\text{mm}^3)$$

a= alan (mm^2) (BAB Bs 200 ProB Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi ile hesaplandı)

k= kesit kalınlığı (her kesit için sabit 5 mikron)

BULGULAR

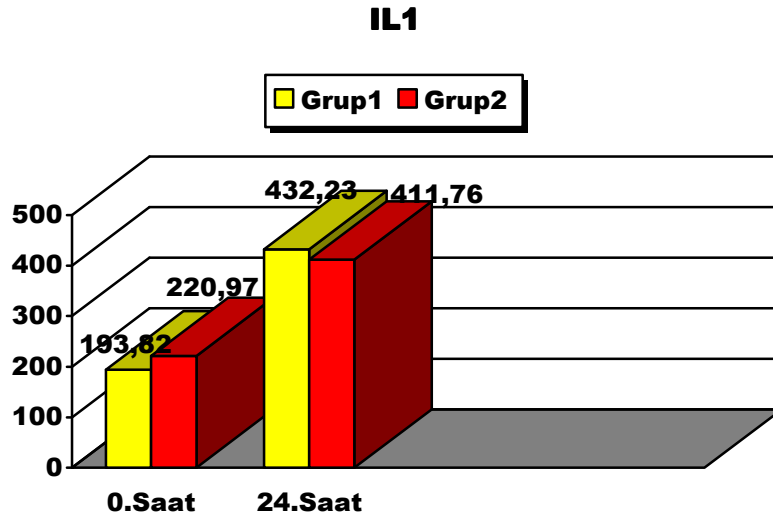
İstatistiksel çalışmalar

Grupların birbiri ile karşılaştırılması ve istatistik çalışmaları SPSS for Windows versiyon 9.05 yardımıyla yapılmıştır.

Her iki grup içi değerleri kendi arasında karşılaştırılmasında Wilcoxon işaretli sıra testi kullanıldı ve istatistiksel olarak anlamlı oranda değişiklikler görülmüştür.($p < 0.05$). Fakat kontrol grubu ile TRH grubu arasındaki karşılaştırmada kullanılan Mann-Whitney-U testinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRUP 1	0. Saat	152.93	159.93	248.99	167.75	99.33	153.81	238.37	211.07	247.36	258.74
	24. Saat	494.85	465.51	298.85	387.08	557.24	493.34	393.23	353.05	399.37	479.82
GRUP 2	0. Saat	206.89	178.09	220.22	191.72	239.19	316.26	137.86	269.25	236.73	213.57
	24. Saat	415.43	406.26	445.85	322.76	364.70	524.78	457.20	359.27	375.52	445.85

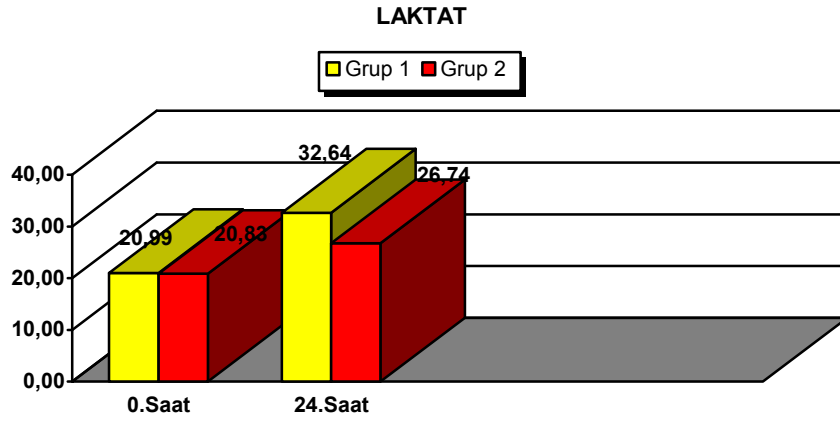
Tablo 1: IL1 β Düzeyleri.



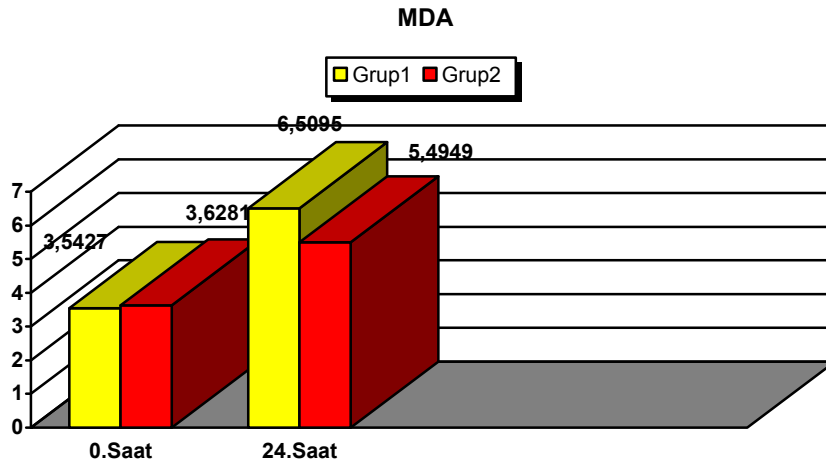
Grafik 1: İki grubun iskemi öncesi ve sonrası ortalama IL1 β değerleri(pg/ml) ($p=0,496$)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRUP1	LAK	19	19,5	24,2	18,5	20,8	21,8	21,0	19,0	23,9	22,2
0. Saat	MDA	3.6127	3.1465	3.4379	3.4962	3.8458	3.3796	3.7875	3.9040	3.5544	3.2631
24. Saat	LAK	46,7	21,7	24,5	20,6	29,7	28,1	28,4	39,9	46,3	40,5
	MDA	5.5356	4.6116	5.3025	4.8946	8.5656	4.2537	10.0224	9.7310	6.1183	6.0600
GRUP2	LAK	27	18,6	23,6	20,6	24,6	21,0	11,1	20,0	22,3	19,5
0. Saat	MDA	3.9623	3.8458	3.7875	3.3213	3.7875	3.6127	3.0300	3.7192	3.4962	3.7192
24. Saat	LAK	22,5	24,8	28,2	27,2	28,4	28,0	37,5	20,6	24,3	25,9
	MDA	4.7198	8.3326	9.3232	4.0789	4.3119	4.2537	3.9040	4.6616	5.9443	5.4191

Tablo 2: BOS laktat ve MDA düzeyleri



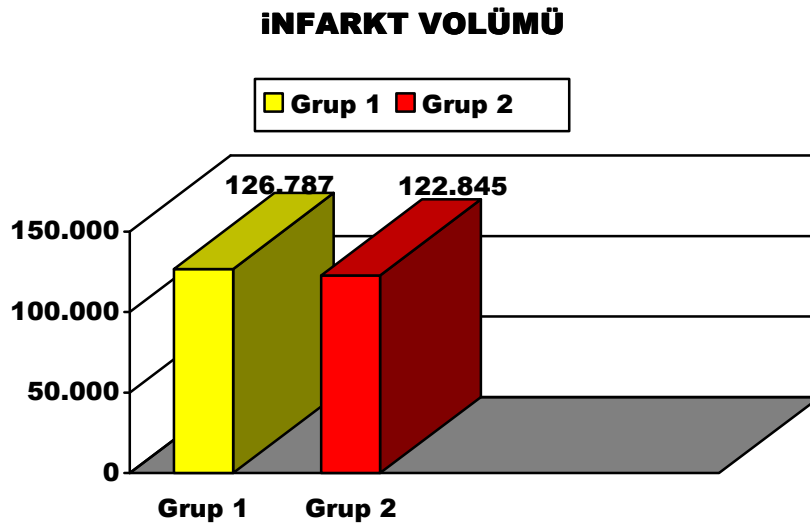
Grafik 2: İki grubun iskemi öncesi ve sonrası ortalama BOS laktat değerleri(mg/dl) (p=0,151)



Grafik 3: İki grubun iskemi öncesi ve sonrası ortalama BOS MDA değerleri(nmol/ml) (p=0,121)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRUP1	Sağ	131,80	126,34	118,72	122,44	101,78	132,26	96,46	126,10	121,96	100,66
24.	Sol	10,38	8,66	7,59	11,47	12,44	9,35	6,53	8,62	8,62	6,10
Saat	Total	142,18	135,00	126,31	133,91	114,22	141,61	102,99	134,72	130,17	106,76
GRUP2	Sağ	123,48	92,64	116,78	131,12	98,64	132,16	126,48	119,22	130,06	98,98
24.	Sol	3,19	4,81	9,13	7,05	3,77	5,19	6,26	11,17	5,11	3,29
Saat	Total	126,67	97,45	125,91	138,17	102,43	137,25	132,74	130,39	135,17	102,27

Tablo 3: Serebral infarkt volümleri



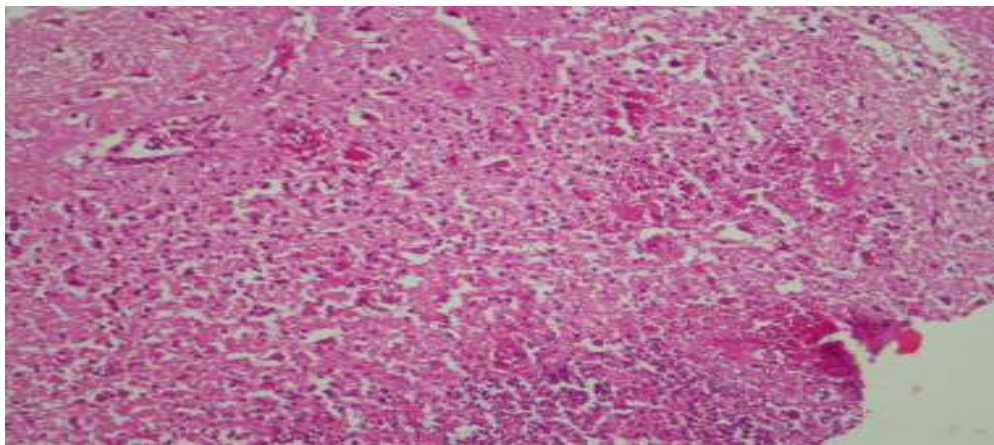
Grafik 4: İki grubun iskemi sonrası oluşan ortalama infarkt volümü değerleri(mm³) (p=0,496)



Resim 4: Tavşan beyninde oluşturulan infarkt alanları.



Resim 5: Sagittal kesitte pariyetal bölgedeki infarkt alanları.



Resim 6: Serebral enfarkt alanı (H&Ex20) Konjesyone damarlar, kanama alanları, lökosit ve lökosit debrisleri içeren infarkt sahasında glial hücreler soluk pembe renkte olup hem sitoplazma hem de nükleer detaylar net olarak seçilememektedir.

TARTIŞMA

Serebrovasküler hastalıklar tüm dünyada morbidite ve mortalitenin en sık nedenlerindedir. Serebrovasküler hastalıkların %85 gibi büyük bir bölümünü oluşturan serebral iskemi global ve fokal olarak iki tipe ayrılır(8).

Fokal serebral iskemide merkezde yoğun iskemik fokus yer alırken periferde yer alan penumbra alanında kolleteral dolaşımın nispeten kanlanan ve elektriksel olarak inaktif ancak enerji ve iyon dengelerini koruyarak canlılığını sürdüren hücreler mevcuttur. Enfarkt alanının merkezindeki primer hasara ek olarak eksitotoksik olay ve bunun oluşturduğu serbest radikal formasyonu penumbra alanındaki hücrelerin ölümüne yol açmakta ve böylece sekonder bir hasar oluşturarak enfarkt alanını genişletmektedir(12, 14, 24)

Beyin yaralanması sırasında yüksek enerjili fosfatlar adenosin ve daha sonra hipoksantine yıkılır. ATP azalması laktat birikimine neden olan anaerobik metabolizmayı artırır(48). Ksantin oksidaz reaksiyonunda süperoksit radikalleri oluşur ve bunlar lipid peroksidasyonunu gerçekleştirir. Lipid peroksidasyon MDA meydana getirir ki bu da tiobarbitirik asitle ölçülebilir Bu arada laktat birikimi intraselüler Ca^{+2} artışına yol açar. Bu durum daha ileri ATP eksikliğine ve daha fazla laktat ve MDA oluşumuna neden olur (48).

MDA yağ asiti oksidasyonunun spesifik yada kantitatif indikatörü değildir ama lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon gösterir. Bu yüzden bu çalışmada laktat ve MDA düzeyleri incelendi. Doku laktat ve MDA seviyeleri nöronal yaralanmadan birkaç dakika sonra yükselmeye başlar ve 1 saat sonra maksimum seviyeye ulaşır(26). Bizde buna dayanarak laktat ve MDA ölçtük. Yaptığımız çalışmada iskemi sonrası 24. saatte ölçülen BOS laktat ve MDA değerlerinin 0. saate ölçülen değerlerden daha yüksek olduğunu tespit ettik .

Fizyolojik durumda sitokinlerin hareketleri oldukça yavaştır. Her nasılsa bu sitokinler beyin yaralanmasını takiben birden aktive olurlar iskemide de bu olayın merkezinde IL1 bulunur. Pek çok deneysel çalışmada IL1 β nın strokta artış gösterdiği görülmüştür(49, 50). Bizim yapmış olduğumuz iskemi modeli sonrası ölçülen IL1 β

değerlerinde de artış tespit ettik. Yapılan çalışmalarda IL1 β nın infarktın gelişmesiyle birlikte erken dönemde (1.saat) arttığı ve artmaya devam ettiği gösterilmiştir. IL1 β nın serebral iskemiden sonra menşei halen tartışmalıdır. En önemli düşünce endotelial hücreler, mikroglia ve makrofaj/monositlerden kaynaklandığıdır(50, 51). Bazı yazarlar ise beyin yaralanmasından sonra IL1 β nın nöronlardan, astrositlerden ve oligodendrositlerden kaynaklandığını söylemektedir(49).

Pek çok yayında IL1 in serebral iskemide rol oynadığı söylemesine rağmen IL1 in patofizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir. Pek çok çalışmada hayvanlarda IL1 β nın intraserebelloventriküler olarak enjekte edildiğinde strokta beyin yaralanmasını dramatik bir biçimde arttırdığı söylenmiştir(52, 53, 54) Bununla birlikte bu çalışmayı ilk yapan Relton ve Rothwell infarkt völümünde belirgin artış tespit etmemişlerdir(55). Tersine pek çok çalışmalarda IL1ra iskemik beyin hastalığında intraserebelloventriküler veya sisternal olarak verildiğinde iskemik beyin yaralanmasında belirgin bir azalma yaptığı belirtmişlerdir(52, 54, 55, 56, 57). Ek olarak bir adenoviral vektör kullanılarak veya IL1 β antikorları enjeksiyonuyla IL1 β yı bloke ederek IL1ra yı beyinde yükseltirler ve iskemik yaralanmada belirgin bir düzelme sağladılar(58, 59). IL1 β nın iskemiye bağlı beyin yaralanmasında nasıl etki ettiğini gösteren kesin kanıtlar yoktur. IL1 in mediatörlerinin etkisi halen bilinmemektedir ancak pek çok hipotez ortaya atılmıştır(47).

IL1 in pleiotrofik etkisi vardır. Nörotransmisyonunda ,glia ve endotel hücrelerinin sitümülyasyonunda,bazı büyüme faktörlerinin sentezinde,TGF- β , IL10 ve IL4 gibi antiinflamatuvar ve antikoagülan sitokinlerin üretilmesinde TNF- α , IL6, IL8, IL2 veya IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezinde rol alır(47).

İskemik hücre yaralanmasında IL1 in yararlı veya zararlı oluşunun net etkisi bazı faktörler tarafından belirlenir. İskemik beyinde üretilen IL1 β miktarı, lokalizasyon ve zaman en önemli faktörlerdir. IL1 in beyin üzerine etkisi iki şekildedir. İlk olarak diğer faktörlerin ortadan kaldırıldığı in vitro bir çalışmada IL1 veya IL1ra nın nöronal hücre üzerine etki ettiği gösterilmiştir. IL1 sinir growth faktörü kullanılarak primer kültürde nöron hücrelerinde nöroprotektif etki ettirdiği gösterilmiştir(60). İnvivo olarak yapılan bir çalışmada ise tersine kültüre nöronlarda nöroprotektif etki etmediği gösterilmiştir. Bununla birlikte IL1 anlaşılabilen bir şekilde glia hücrelerini sarar ve onunla kompleks tki oluşturarak nöronal yaşam veya ölüme etki eder(61).

Bizim çalışmamız da serebral hipoksi oluşturulan deneklerde TRH nöroprotektif etkisi üzerine yapılmıştır. TRH'nın nöroprotektif etkilerinin mekanizmaları tartışma halindedir. Bunlar arasında serebral noradrenalin metabolizmasının artışı, opioid sistem antagonizması, lökotrien ve trombosit aktive edici faktörler, serebral kan akımı artışı, iyon hemoastazı ve sellüler biyoenerjik durum sayılabilir(43).

TRH'nın santral sinir sistemindeki rolü birbiriyle ilişkili 4 komponenti bulunan anatomik ve foksiyonel bölgede incelenebilir. Bu komponentler 1-hipotalamik, hipopitüeterik nöroendokrin sistem 2-beyin sapı, midbrain, spinal kord sistemi 3-limbik ve kortikal sistem 4-kronobiyojik sistem TRH'nın santral sinir sisteminin aktivitesinde modülatör rol oynayarak aktivite normalize edici etkileri gösterilmiştir(43).

Çalışmalarda TRH veya TRH analoglarının periferal, intrasisternal uygulanması birçok etkiye yol açmıştır(62). Bunlar arasında gastrik asit sekresyonu sitimülasyonu, kalp hızının artması, kan basıncında yükselme, adrenal medulladan ketakolamin deşarjı, respiratuar eforda artış, çok sayıda davranışsal etkilerinin yanı sıra bir çok otonomik modülasyonda TRH'nın adaptif süreçte, strese karşı vücut cevabında rol oynadığı düşünülmektedir(43).

TRH uygulanmasına bir başka yanıt sedasyonun geri çevrilmesini içermektedir(63). Ethonol veya barbitüratlarla sağlanan uyku halinin kısılması ve aynı zamanda santral sinir sistemi depresanlarından opiat, fenotiazinler ve benzodizepinler içinde geçerli olmaktadır. Bizim çalışmamızda da TRH verilen bazı deneklerin anestezisi altında erken uyandıkları görülmüştür. Mikro enjeksiyon çalışmalarında bu analeptik etkinin nöroanatomikal substratları incelenmiş olup mediyal septal bölgede özel bir hassasiyet tespit edilmiştir. Bu davranışsal cevabın döngüsünde klasik kolinerjik septohipokampal projeksiyon yolları yer alır(43). Ek olarak TRH'nın diğer bir çok etkilerinde kolinerjik yollar aracılığıyla ortaya çıktığı bilinir(64).

TRH nöronal sistemlerin nöbet eşiğini düşürücü etkilerine dair bir çok kanıt vardır(65). Bizim çalışmamızda da TRH verilen bazı deneklerin nöbet geçirdikleri tespit edilmiştir.

Elektrofizyolojik çalışmalar TRH'nin serotonin ile birlikte motor nöron aktivitesi ve spinal refleksler üzerine etkileri olduğu göstermektedir. Ayrıca bazı bulgular TRH ve serotonin sinerjik etkileri olduğu göstermiştir(42). Bir çok hayvan modelinde spinal kord hasarı sonrası uygulanan TRH motor fonksiyonların gelişmesini sağlamıştır(42).

Yapılan başka bir çalışmada ratlarda yapılan orta serebral arter oklüzyon modelinde TRH ile iskemik infarkt volümünde azalma olmadan TRH'nin farmakolojik özelliğinden dolayı nörolojik defisitlerde düzeltici etkisi bulunmuştur(66). TRH analogu YM-14673 ile ratlarda yapılan orta serebral arter oklüzyon modelinde nörolojik defisitlerdeki iyileşmeyi hızlandırdığı tespit edilmiştir(66).

Yeni TRH analogu olan JTP- 2942 ile yapılmış deneysel infarkt çalışmasında sensorimotor aktivitede özellikle kas gücünde ve motor defisitlerde düzelme görülmüştür(67). Bu etkileri infarkt boyutunda değişiklik ile bağlantılı olmayıp bu analogun düzeltici etki mekanizmasının sinaptik bileşelerde değişiklik veya onlarda aktivasyon sağlayarak bu analogun düzeltici etkisini bu mekanizma ile ilişkilendirilmiştir(67).

Bizim de yaptığımız çalışmada sentetik TRH analogu olan protirelinin tek doz bolus intratekal olarak verildi. Yapılan ölçümler sonrasında infarkt volümünde anlamlı bir azalma tespit etmedik.

SONUÇ

Bu çalışmamızda iskemi sonrası intratekal bolus şeklinde verilen TRH'nın serebral infarkt völümünde, iskemi mediatörü olan IL1 β ve iskemi sonrası oluşan laktat ve MDA değerlerini araştırdık. Araştırmamız sonucunda serebral iskemide uygulanan TRH'nın serebral enfarkt völümünde, serum IL1 β ve BOS laktat ve MDA değerlerinde minimal bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak değişikliğin anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu bilgilere dayanılarak TRH'nın serebral nöroprotektif etkinliğini araştırmak için daha ileri ve geniş klinik çalışmaların yapılması kanaatindeyiz.

ÖZET

Bu çalışmamızda homolog kan ile yapılan serebral embolizasyon sonrası intratekal bolus şeklinde verilen TRH'nin etkinliği araştırılmıştır.

Yapılan çalışmamızda 2 grup şeklinde toplam 20 adet, 2-3 kg ağırlığında Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Tavşanların herbirinin kulak veninden 1.5 ml kan ve sisterna magnasından 1,5ml BOS alındı. İlk gruba sadece embolizasyon işlemi uygulandı. 2.gruba embolizasyon işleminden 45 dakika sonra intratekal 0.2mg/kg TRH verildi. Embolizasyondan sonra tavşanlar 24 saat yaşatıldı ve 24 saatin sonunda tekrar 1.5ml kan ve 1.5ml BOS örnekleri alındı. İntrakardiyak hava verilerek öldürüldü. Ölümünden hemen sonra tavşanların beyinleri çıkartılarak % 10'lik formaldehit solüsyonu içinde bir hafta bekletildi. Enfarkt volümleri hesaplandı.

Yaptığımız bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan serebral iskemi sonrası intratekal bolus şeklinde verilen TRH; iskemi sonrası oluşan ürünlerden laktat ve MDA, iskemi mediatörlerinden IL1 β ve serebral enfarkt volümünde istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

SUMMARY

In this study effects of given iv. bolus intratechal TRH, after cerebral embolization using homolog blood was observed.

In this study 20 white New Zeland rabbit each were 2-3 kg weighted divided into 2 group. 1.5 ml blood from ear vena and 1.5ml CSF from cisterna magna taken from each rabbit . Only embolization was performed first group. Intratechal TRH 0.2 mg/kg was given after embolization to the second group. 24 hours after embolization 1.5ml blood and 1.5ml CSF was taken from each rabbit. Rabbits were killed by intracardiac air application. Each rabbit decapitated and brain tissue obtained. Each brain taken into %20 formaldehyd solution for a week. Then brain sections were observed for measuring infarct volume.

In this study given intratechal bolus TRH after experimental cerebral ischemia have no statically significant effects on cerebral infarct volume and the levels of MDA, lactate, ischemia mediatör IL1 β .

KAYNAKLAR

- 1-Sacco R.L., Wolf P.A., Gorelick P.B.: Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond. *Neurology*. 1999; 53(suppl 4): 15-24
- 2-Ay H., Dalkara T.: İskemik penumbra ve terapötik zaman aralığını etkileyen faktörler. *Serebrovasküler Hastalıklar* (Ed) Prof. Dr. Sevin Balkan, Güneş Kitabevi 2002; 28-37.
- 3-Kumral E, Balkır K.: İnme epidemiyolojisi. *Serebrovasküler Hastalıklar*, (Ed) Prof. Dr. Sevin Balkan, Güneş Kitabevi 2002; 15-27.
- 4-Adams R.D., Victor M.: *Cerebrovascular Diseases. Principles of Neurology*. Fourth Edition, Mc.Grow Hill Co. Singapore 1989;624-643.
- 5-Demirkaya S., Vural O.: Serebral kan akımı ve serebral metabolizma. *Serebrovasküler Hastalıklar*, (Ed) Prof. Dr. Sevin Balkan, Güneş Kitabevi 2002; 15-27.
- 6-Collins RC, Dobkin BH, Choi DW : Selective vulnerability of the brain: New insights into the pathophysiology of stroke. *Ann Intern Med* 1989; 110: 992-1000
- 7-Osterholm J.L., Frazier G.D.: Pathophysiological consequences of brain ischemia. *Neurosurgery*, Vol 2 (eds) Wilkins RH., Rengachary S.S., Mc Grow Hill Co, Newyork, St. Luis 1996;2033-37.
- 8-Ratcheson RA, Kiefer SP, Selman WR : Pathophysiology and clinical evaluation of ischemic cerebrovascular disease. in Youmans JR (Ed). *Neurological Surgery* 4th ed. USA: WB Saunders Co., 1996; 44:1-28
- 9-Silver IA, Erecinska M: Intracellular and extracellular changes of(Ca^{+2}) in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* 1990; 95:837-866
- 10-Siesjö BK : Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 1990; 30(suppl 2):3-9
- 11-Orrenius S, Ankarcróna M, Nicotera P : Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv Neurol* 1996; 71:137-151
- 12-Patel RK, Mc Andrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411 :385-400
- 13-Procter AW : Can we reverse ischemic penumbra? Some mechanism in the pathophysiology of energy-compromised brain tissue. *Clin Neuropharmacol* 1990; 13 suppl 3:34-39

14-Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML: Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1991; 5:755-767

15-Fellman V, Raivio KO : Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 1997; 41 (5): 599-606

16-Schmidley JW : Free Radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21 (7): 1085-1090

17-Southom PA, Powis G : Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63:381-389

18-Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 1957; Aug;58(2):193-201.

19-Olney JW, Sharpe LG.: Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969; Oct 17;166(903):386-8.

20-Kimura M, Sawada K, Miyagawa T, Kuwada M, Katayama K, Nishizawa Y : Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium and sodium channels in the extracellular glutamate/aspartate accumulation and subsequent neuronal injury induced by oxygen/glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285(1): 178-185

21-DeLorenzo RJ, Limbrick DD : Effects of glutamate on calcium influx and sequestration/extrusion mechanisms in hippocampal neurons. *Adv Neurol* 1996; 71:37-46

22-Nicholls D, Attwell D : The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS* 1990; 11: 462-468

23-Velazquez JLP, Frantseva MV, Carlen PL : In vitro Ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and Intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1997; 17(23):9085-9094

24-Siesjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. II. Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992; 77:337-354

25-Lazarewicz JW : Calcium transients in brain ischemia: role in neuronal injury. *Acta Neurobiol Exp* 1996; 56:299-311

26-Jae Kyu Ruh M.D.,Seung-Bong Hong M.D.,Byung-Woo Yoon M.D.Myung-Suk Kim M.D, Hojin Myung M.D: The effect of hyperglycemia on lipid peroxidation in the global cerebral ischemia of the rats *Jor of Kor med sce* 1992; 7(1) 40-46

27-Kluge H : Calcium and hypoxic/ischemic brain damage- some critical and conceptual remarks. *Exp Pathol* 1991; 42:239-244

- 28-Kristian T, Ouyang Y, Siesjö BK : Calcium-induced neuronal cell death in vivo and in vitro: Are the pathophysiologic mechanisms different? *Adv Neurol* 1996; 71: 107-118
- 29-Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33:71-90
- 30-Ikeda Y, Long DM : The molecular basis of brain injury and edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 1990; 27(1): 1-11
- 31-LindahI P., Johansson B.R., Leveen P., Betsholtz C.: Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-Deficient mice. *Science*1997;277:242-245
- 32-Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rotlman SM, Lin T-S, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate *J Neurosci* 1995; 15:6377-88
- 33-Siesjo BK, Katsura KI, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischaemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 1995; 12(5):943-56
- 34-Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, Vliet A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;(7) 391:393
- 35-Pardridge W.M.: Blood-brain barrier biology and methodology (Review) *Journal of NeuroVirology*, 1999; 5: 556-569,
- 36-Hokfelt T, Fuxe K, Johansson O, Jeffcoate S, White N.: Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur J Pharmacol.*1975; Dec:34(2):389-92.
- 37-Jackson IM.: Thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med.* 1982; Jan 21;306(3):145-55
- 38-Pizzi M, Boroni F, Benarese M, Moraitis C, Memo M, Spano PF: Neuroprotective effect of thyrotropin-releasing hormone against excitatory amino acid-induced cell death in hippocampal slices *Eur jou of Phar* 1999; 370:133-137
- 39-Miyamoto M, Nagai Y, Narumi S, Saji Y, Nagawa Y.: TRH and its novel analog (DN-1417): antipentobarbital action and involvement of cholinergic mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav.*1982; Oct; 17(4):797-806.
- 40-Heal DJ, Green AR.: Administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) to rats releases dopamine in n. accumbens but not n. caudatus. *Neuropharmacology.* 1979; Jan; 18(1):23-31.

41-Sumi Y, Yamada H, Sakai N, Tanabe Y, Hirata T.: Effects of so-called cerebral circulation or metabolism facilitating agents on cerebral function undergoing temporary anoxia--an experimental study in the isolated, perfused rat's brain model (author's transl) *No To Shinkei*. 1980; Nov;32(11):1109-16. Japanese

42-Faden A.I,MD;Thomas P.Jacobs,MA;and Michael T. Smith,MD: Thyrotropin-Releasing Hormone in experimental spinal injury *Neurology*1984;34:1280-1284

43-Keith A,Gary Kevin A Sevarino,George G ,Yarbrough Arthur J. ,Prange JR :The thyrotropin-releasing hormone(TRH) hypothesis of homeostatic regulation:implications TRH-based therapeutics *The Journal of Pharmacology* 2003; 305:410-416

44-Metcalf G.: Regulatory peptides as a source of new drugs--the clinical prospects for analogues of TRH which are resistant to metabolic degradation. *Brain Res*. 1982; Nov;257(3):389-408.

45-Shrewsbury-Gee J,.Lye R.H,.Latham A,Slater P:The Effect Of TRH analogues on cerebral ischemia produced by middle cerebral artery occlusion in the rat *Exp Brain Res* 1998; 70:342-350

46-Faden AI, Jacobs TP, Holaday JW.: Thyrotropin-releasing hormone improves neurologic recovery after spinal trauma in cats. *N Engl J Med*.1981;Oct29;305(18):1063-7.

47-Touzani O,Boutin H,Chuquet J,Rothwell N:Potential mechanism of interleukin-1 involvement in cerebral ischemia *Jou of Neuroimmu* 1999;100:203-215

48-Cheeseman KH,Slater TF.An introduction to free radical biochemistry. *Br.Med.Bull* 1993;49(3):479-480

49-BannonPG,DawesJ,DeanRT.: Malformin A prevents IL-1 induced endothelial changes by inhibition of protein synthesis. *Thromb Haemost*. 1994; Sep;72(3):482-3.

50-Buttini M, Sauter A, Boddeke HW.: Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994; Apr;23(1-2):126-34.

51-Ju DW, Zheng QY, Cao X, Fang J, Wang HB.: Esculentoside A inhibits tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 production induced by lipopolysaccharide in mice. *Pharmacology*.1998;Apr;56(4):187-95.

52-Loddick SA, Rothwell NJ.: Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*.1996;Sep;16(5):932-40.

53-Stroemer RP, Rothwell NJ.: Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998; Aug;18(8):833-9.

54-Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K.: Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995; Apr;26(4):676-80

55-Relton JK, Rothwell NJ.: Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*. 1992; Aug;29(2):243-6.

56-Lin MT, Kao TY, Jin YT, Chen CF.: Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the heat stroke-induced neuronal damage by reducing the cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull*. 1995;37(6):595-8.

57-Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA.: Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 1996; Apr;138(2):206-13.

58-Betz AL, Yang GY, Davidson BL.: Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995; Jul;15(4):547-51.

59-Yang GY, Liu XH, Kadoya C, Zhao YJ, Mao Y, Davidson BL, Betz AL.: Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998; Aug;18(8):840-7.

60-Strijbos PJ, Rothwell NJ.: Interleukin-1 beta attenuates excitatory amino acid-induced neurodegeneration in vitro: involvement of nerve growth factor. *J Neurosci*. 1995; May;15(5Pt1):3468-74.

61-Rothwell NJ.: Cytokines and acute neurodegeneration. *Mol Psychiatry*. 1997; Mar;2(2):120-1.

62-Horita A, Carino MA, Lai H.: Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986;26:311-32.

63-Horita A.: An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci*. 1998;62(17-18):1443-8

64-Yarbrough GG.: Thyrotropin releasing hormone and CNS cholinergic neurons. *Life Sci*. 1983; Jul 11;33(2):111-8

65-Kubek MJ, Garg BP.: Thyrotropin-releasing hormone in the treatment of intractable epilepsy. *Pediatr Neurol*. 2002; Jan;26(1):9-17.

66-Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, Shimizu-Sasamata M, Sano K, Effect of Thyrotropin-Releasing Hormone on behavioral disturbances in middle cerebral artery-occluded rats *Eu Jour Of Pharm* 1991; 197:117-123

67-Yonemori F, Yamaguchi T, Nakayama H, Narita K, Hojo S, Tamura A: Effect of JTP-2942, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on motor deficits after chronic focal cerebral ischemia in rats *J. of CBF and Met* 2000; 20:74-81

TEŞEKKÜR

Nöroşirürji kliniğinde;

Baőta tezimi hazırlamamda bana yardımcı olan saygıdeğer hocam merhum Prof.Dr.Osman ACAR'a teőekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca , bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan hocalarıma,kıdemlilerime, yakın dostluk ve destekleri gördüğüm tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimde kullandığım parametrelerde bana yardımcı olan Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Uzm.Dr.H Hasan ESEN, Dr.Sami ERDEM, Dr.Lütfü Saltuk DEMİR ve Dr.Bahadır FEYİZOĞLU'na teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eőime tüm özveri ve desteklerinden dolayı teőekkürlerimi sunarım.