



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL ORTA SEREBRAL ARTER OKLÜZYONU SONUCU
GELİŞEN SEREBRAL İSKEMİK ZEDELENMENİN
ÖNLENMESİNDE MEKSİLETİNİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özkan ÖZGER

Ankara, 2007



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL ORTA SEREBRAL ARTER OKLÜZYONU SONUCU
GELİŞEN SEREBRAL İSKEMİK ZEDELENMENİN
ÖNLENMESİNDE MEKSİLETİNİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özkan ÖZGER

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Arif Tarkan ÇALIŞANELLER

Ankara, 2007

12.04.2005 tarih ve DA 03/17-2005-AP-453 sayı

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Biz genç hekimlere tıpta uzmanlık eğitimi olanağı sağladığı ve çağdaş bir üniversite kurup bize her türlü desteği verdiği için rektörümüz Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, dekanımız Sayın Prof. Dr. Faik Sarıalioğlu'na, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve her konuda destek aldığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nur Altınörs'e, Prof. Dr. Hakan Caner'e ve Doç. Dr. Başar Atalay'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu'na ve bir dönem birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Murad Bavbek'e eğitimime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında ve yürütülmesinde destek ve bilgisini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tarkan Çalışaneller'e, eğitimim süresince her konuda destek olan Uzm. Dr. Cem Yılmaz'a, tezimin her bölümünde emeği bulunan Uzm. Dr. Salih Gülşen'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Cerrahi eğitimime katkılarından dolayı Doç. Dr. Bülent Erdoğan'a, Yrd. Doç. Dr. Orhan Şen'e, Uzm. Dr. Özgür Özdemir'e teşekkür ederim.

İhtisas süresince beraber çalıştığım Uzm. Dr. Melih Çekinmez'e, Uzm. Dr. Aşkın Hastürk'e, Dr. Eralp Çetinalp'e, Dr. Cemal Gökce'ye, Dr. Erkin Sönmez'e, Dr. İlker Çöven'e, Dr. Fatih Aydemir'e, Dr. Aydın Gerilmez'e, Dr. Aykan Akar'a ve Dr. Berkay Köksoy'a teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Hale Tufan'a ve araştırma laboratuvarı ekibine, histopatolojik incelemelerde değerli katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Özlem Özen'e teşekkür ederim.

Dr. Özkan ÖZGER

ÖZET

Beyinde gelişen iskemik zedelenmenin patogeneğinde serbest radikaller, lipid peroksidasyonu, artmış hücre içi sodyum ve kalsiyum konsantrasyonları rol oynamaktadır. Çalışmamızda sodyum ve kalsiyum kanal blokörü olmasının yanında antioksidan ve serbest radikal oluşumunu önleyici özellikleri bulunan meksiletinin iskemik beyin zedelenmesindeki tedavi edici rolü incelenmiştir. Daha önceki çalışmalarda meksiletinin deneysel subaraknoid kanama sonrası gelişen serebral vazospazmın ve travmatik spinal kord zedelenmesinin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada ağırlıkları 285-425 gram arasında olan 30 adet erkek erişkin Sprague-Dawley ırkından ratlar kullanıldı. Mikrokraniektomi ile ratlara sol orta serebral arter oklüzyonu uygulanarak eş zamanlı olarak bilateral karotid arterler kliplendi. Hayvanlar herbiri 10 rattan oluşan 3 gruba ayrılmıştır. Postoperatif 1. saatte, sadece iskemi uygulanan gruba herhangi bir tedavi verilmezken sham grubuna normal salin, tedavi grubuna meksiletin verildi. Postoperatif 24. saatte, ratlara ağır anestezi verilerek ratlar sakrifiye ve dekapite edildi. Beyinleri bir bütün olarak çıkarıldıktan sonra %10'luk formol çözeltisinde 1-2 gün bekletildi. Standart doku takibine alınarak parafin bloklara rostro-kaudal yönde gömüldü. Gerekli işlemlerden geçtikten sonra parafin bloklardan kızaklı mikrotomla alınan 20µm'lik koronal kesitler hematoksilin-eozin (H&E) boyası ile boyandı. Elde edilen preparatlardan bilgisayar yardımıyla ve gerekli yazılımlar kullanılarak serebral enfarkt hacimleri hesaplandı.

Serebral enfarkt volümleri ANOVA ve Post-Hoc Bonferroni testleri kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçta kontrol ($121,57 \pm 11,41 \text{ mm}^3$) ve sham ($116,08 \pm 12,36 \text{ mm}^3$) grupları ile tedavi grubu ($81,98 \pm 12,58 \text{ mm}^3$) arasında meksiletinin serebral iskemide koruyucu etkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0,0001$) saptandı.

Meksiletin, multipotent etkinliği nedeniyle serebral iskeminin önlenmesinde ve tedavisinde alternatif bir ilaç olarak düşünülmeli ve bu konuda zamana bağımlı olarak daha fazla deneysel çalışma yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Meksiletin, orta serebral arter oklüzyonu, serebral enfarkt volümü, serebral iskemi

ABSTRACT

The Preventive Effect of the Mexiletine on Cerebral Ischemic Injury Following Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion

Occurrence of free radicals, intracellular sodium and calcium accumulation, and lipid peroxidation has crucial role in developing brain ischemic injury. In our study we investigated the effects of the mexiletine on brain ischemic injury. Mexiletine has some important features in the prevention of ischemic brain injury such as, sodium and calcium canal blockage and prevention of the free radical occurrence. Previous studies demonstrated that mexiletine has beneficial effect on spinal cord injury and cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage.

In this study, thirty adult-male Sprague-Dawley rats weighting between 285 and 425 grams were used. Left middle cerebral artery occlusion were performed following microcraniectomy and simultaneous bilateral carotid artery occlusion were performed. One hour later carotid clips were removed. Animals were separated into three different groups. There were ten rats in each group. All rats in three groups insulted with ischemia. There were no drug application to the rats in control group, saline were applied to the rats in sham group, mexiletine were applied to the rats in treatment group. After twenty four hours from ischemic insult, all rats were decapitated following sacrifice using high dose anesthetic agent. Following whole brain extraction from the cranium, brains were kept in the 10 % formaldehit solution for one or two days. Brains were rostrocaudally embedded in paraffin blocks following standard tissue treatment to the brains. Paraffin blocks were treated according to our procedure. After this procedure, paraffin blocks were cut with microtome which was arranged for cutting into paraffin blocks to the thickness 20µm of slices. All slices were dyed with hemotoxilen-eosine (H&E). After the dying of the slices, cerebral infarct volumes were calculated using computer and appropriate software programs.

Cerebral infarct volumes were compared using ANOVA (Analysis of variance) and Post-Hoc Bonferroni test. The results showed statistically significant ($p < 0,0001$) differences between treatment group ($81,98 \pm 12,58\text{mm}^3$) and control ($121,57 \pm 11,41\text{mm}^3$) and sham ($116,08 \pm 12,36\text{mm}^3$) groups.

Mexiletine should be considered as an alternative medication for prevention and treatment of the ischemic brain injury due to its multipotent effects and further experimental studies are needed.

Key Words: Cerebral ischemia, cerebral infarct volume, mexiletine, middle cerebral artery occlusion

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serebral İskeminin Tanımı	2
2.2. Serebral İskeminin Tarihçesi	2
2.3. Serebral İskeminin Epidemiyolojisi	3
2.4. Serebral İskeminin Risk Faktörleri	3
2.5. Serebral İskeminin Etyopatogenezi	5
2.6. Serebral İskemi-Reperfüzyon Fizyopatolojisi	6
2.6.1. Transmembran iyon pompasının bozulması	6
2.6.2. Eksitator nörotransmitter salınımı	7
2.6.3. Hücre içi kalsiyum serbestleşmesi	9
2.6.4. Reaktif oksijen ürünlerinin (Serbest radikaller) ortaya çıkması	9
2.6.5. Lipid peroksidasyon ve araşidonik asit metabolitlerinin ortaya çıkması	10
2.6.6. İskemide endotel ve lökositlerin rolü	12
2.6.7. İskemide nitrik oksit (NO) rolü	16
2.6.8. Anaerobik glukolizis	16
2.6.9. İskemide adenozinin rolü	17
2.6.10. İskemide kompleman sisteminin rolü	17
2.6.11. İskemik tolerans (Stress proteinleri)	17
2.6.12. Apoptozis	17
2.7. Meksiletinin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Deney Grupları	21
3.1.2. Meksiletinin ve normal salinin deneyde kullanılması	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Anestezi	21
3.2.2. Cerrahi İşlem	21
3.2.3. Histopatolojik İnceleme	23
3.2.4. İstatistiksel Verilerin Değerlendirilmesi	27
4. BULGULAR	28
4.1. İstatistiksel değerlendirme	28
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
7. KAYNAKLAR	37

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

A	: Kesit görüntüsünün alanı
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit
ANOVA	: Analysis of variance
a (p)	: Bir noktanın temsil ettiği alan
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
Calpain	: Calcium activated neutral proteases
GABA	: Gama-Amino-Bütirik asit
GM-CSF	: Granülosit monosit-koloni stimülan faktör
EGF	: Endotelyal Growth Faktör
Σp	: Kesit görüntüsüne düşen toplam nokta sayısı
ER	: Endoplazmik Retikulum
ET	: Endotelin
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H&E	: Hemotoksilen Eozin
HSP	: Heat-shock proteinleri
ICAM-1	: İntrastoplazmik Sellüler Adezyon Molekülü-1
IL	: İnterlökin
i.p	: İntraperitoneal
LTC ₄	: Lökotrien C ₄
LTD ₄	: Lökotrien D ₄
LTE ₄	: Lökotrien E ₄
Na ⁺	: Sodyum
NK	: Natural Killer Cell
NMDA	: N-Methyl-D-Aspartate
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
OH ⁻	: Hidroksil radikali
OSA	: Orta Serebral Arter

PAF	: Platelet aktive edici faktör
PAI-1	: Plazminojen aktivator inhibitörü-1
PGD	: Prostoglandin D
PGE	: Prostoglandin E
PGF _{2α}	: Prostoglandin F _{2α}
PGI ₂	: Prostoglandin I ₂
SD	: Standart sapma
SOD	: Süperoksit dismutaz
SVH	: Serebrovasküler hastalık
SSS	: Santral Sinir Sistemi
t	: Dilim kalınlığı
TF	: Tissue Factor
TFPI	: Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF-beta	: Transforming growth faktör-beta
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TPA	: Doku plazminojen aktivatörü
TxA ₂	: Tromboksan A ₂
V	: Serebral enfarkt hacmi
VCAM-1	: Vascular cell adhesion molecule-1
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil no:

Sayfa no:

2.1.	Meksiletin ve oksidatif metabolitlerinin kimyasal yapısı.....	19
4.1.	Ratlarda sol orta serebral arter oklüzyonu sonrası her 3 grupta enfarkt hacimlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması	30
4.2.	OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter O ₂ saturasyon (%) değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması	30
4.3.	OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pCO ₂ değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması.....	31
4.4.	OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pH değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması.....	31
4.5.	OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pO ₂ değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması.....	32

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo no:

Sayfa no:

2.1.	İskemik inme risk faktörleri	4
2.2.	İskemide rol oynayan faktörler.....	6
2.3.	Glutamat reseptörleri	8
2.4.	Fenton reaksiyonu	10
2.5.	Haber-Weiss reaksiyonu.....	10
4.1.	Çalışma grubundaki enfarkt volüm ortalamaları ve standart sapmaları	29
4.2.	Tüm gruplar için uygulanan ANOVA testi	29
4.3.	Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Bonferroni testi	29

RESİMLER DİZİNİ

Resim no:

Sayfa no:

3.1. Kullanılan cerrahi mikroskop ve cerrahi alan.....	20
3.2. Ratlarda sol temporal mikrokraniektomi sonrası sol orta serebral arter.....	22
3.3. Karotid arterlerin mikroklipe geçici olarak kliplenmesi	23
3.4. Dekapitasyon sonrası elde olunan sol OSA oklüzyonu yapılmış sol serebral enfarkt alanı	24
3.5. Sadece iskemi oluşturulan grupta hematoksilen-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)	24
3.6. Sham (Normal Salin) grubunda hematoksilen-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)	25
3.7. Meksiletinle tedavi edilmiş grupta hematoksilen-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)	26

1.GİRİŞ

İskemik serebrovasküler hastalıklar önemli morbidite ve mortalite sebepleridir. Beyin dokusunu besleyen arterlerin çeşitli nedenlerden dolayı gelişen tromboembolik oklüzyonları sonucunda bu arterlerin beslediği beyin bölgelerinde bir dizi iskemik ve hipoksik olaylar zinciri başlamaktadır. Bu süreçte birçok değişik mekanizma devreye girmektedir. Bu zincirde açığa çıkan serbest radikaller ve lipid peroksidasyon etyopatogeneizde önemli rol oynamaktadır (107). Ortaya çıkan bu serbest radikaller hücrelerin lipid, protein ve nükleik asit yapılarında tahribata yol açarlar (108). Gelişen oksidatif stres sonucu zayıflayan antioksidan mekanizmalar da bu tahribatın genişlemesine katkıda bulunurlar (2). Artmış intrasellüler kalsiyum konsantrasyonlarının da serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonla birlikte hücre ölümüne katkısı olduğu bilinmektedir (109, 110).

Serbest radikallerin ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının iskemik zedelenmenin patogenezindeki bu önemli rollerinden dolayı literatürde iskemik beyin zedelenmesinin önlenmesinde pek çok antioksidan ve kalsiyum kanal blokörü denenmiştir (111, 112). Literatürde meksiletinin deneysel subaraknoid kanama sonrası gelişen serebral vazospazmın ve travmatik spinal kord zedelenmesinin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (113, 114). Bu çalışmada, antioksidan özelliklerinin yanında bir kalsiyum kanal blokörü, ATP (Adenozin trifosfat) sensitif potasyum kanal aktivatörü ve sodyum kanal blokörü olan meksiletinin iskemik beyin zedelenmesini önlemedeki rolü incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebral İskeminin Tanımı

Serebral iskemi beyin kan akımının azalması veya kesilmesi sonucu enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan, nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan olaylar zinciridir (1, 2).

Serebrovasküler hastalık (SVH) beynin bir veya birden çok damarının patolojik süreçler sonucu doğrudan tutulduğu ani başlangıçlı fokal veya global nörolojik semptomlar olarak tanımlanır (19, 20).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) inmeyi ani gelişen, 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen, damarsal kökenli, fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile oluşan klinik bulgular olarak tanımlamıştır (20, 21).

2.2. Serebral İskeminin Tarihçesi

İlk kez 1905 yılında Chiari internal karotid arterin intrakranial dallarında trombüs oluşumunu ve bu trombüslerin karotid bifurkasyon yakınında yerleşmiş olan ateromatöz plaklardan kaynaklandığını tanımlamıştır. İnme patogenezinde karotid oklüzyonun önemi 1914 yılında Hunt tarafından vurgulanmıştır. 1951 yılında ise Fisher internal karotid arter hastalıklarının serebral enfarkt gelişiminde önemli bir rol oynadığını, karotid oklüzyonunun genişlemiş bir subintimal aterom üzerine süperempoze olan trombozis sonucu olduğunu ve trombotik fragmanların intrakranial serebral dolaşımı embolize edebileceğini ileri sürmüştür. İskemik serebrovasküler hastalıkların etyopatogenezinde bu gelişmeler olurken ilk kez 1953 yılında Strully servikal segmentinde tromboze olan internal karotid arterde tromboendarrektomiye gerçekleştirmiştir. 1955 yılında ise Lin serebrovasküler cerrahide tıkalı segmentin rezeksiyonu ve otogen ven grefti ile anastomozu tarif etmiştir. Bunu izleyen yıllarda büyük bir gelişme görülmemiş ancak 1967 yılında Yaşargil ve Donoghy öncelikle internal karotid arterin stenoz ve tromboembolik hadiselerinde serebral kollateral sirkülasyonu arttırmak için süperfisial temporal arter ile

orta serebral arter (OSA) arasında mikrovasküler anastomozu gerçekleştirerek yeni bir çığır açmışlar ve serebral revaskularizasyonu güncel hale getirmişlerdir (18).

2.3. Serebral İşkeminin Epidemiyolojisi

Tüm inmelerin %75'ini serebral enfarkt, %7-15'ini intraserebral hematom, %2-8'ini subaraknoid kanama oluşturur. İnme nedeniyle ölümlerin coğrafi dağılımı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Her ülkede farklı olmakla birlikte, 40-69 yaş arası; SVH'tan ölüm oranı erkeklerde 40-250/100.000 ve kadınlarda 20-160/100.000' dir. Doğu Avrupa lkelerinde ve Japonya'da bu oranlar artmaktadır. Irklar arasında da farklar vardır. Örneğin Amerikalı zencilerde beyazlara göre SVH'tan ölüm oranı her iki cinsiyette de 2,5 kat fazladır (19, 20).

Yaşlara göre yıllık inme insidansı 55-64 yaş arasında 1.7-3.6/1000, 65-74 yaş arasında 4.9-8.9/1000, 75 yaş üzerinde 13.5-17.9/1000'dir. Erkeklerde 55-64 yaş arası inme insidansı kadınlara göre 2-3 kat daha fazla iken ileri yaşlarda bu fark azalmaktadır (21).

İnme prevelansı ise inme insidansına ve yaşayabilen hastalara bağlı olup bu oran yaşla birlikte artmaktadır. Batı lkelerinde inme prevelansı 8/1000, Japonya'da 20/1000 olarak bildirilmiştir (22).

2.4. Serebral İşkeminin Risk Faktörleri

Bir hastalığın oluşmasında yatkınlık yaratan sebepler risk faktörü olarak tanımlanır. Akut iskemik inme olasılığını arttıırırlar (20, 21, 23). Bu risk faktörleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. İskemik inme risk faktörleri

1- Değişirilemez risk faktörleri

- Yaş
- Cinsiyet
- İrk
- Ailesel/Hereditör özellikler

2- Değişirilebilen risk faktörleri

a) Kesinleşmiş faktörler

- Hipertansiyon
- Diabetes Mellitus
- Kardiak hastalıklar
- Geçici iskemik atak
- Hiperkolestrolemi ve bazı lipid alt gruplarının yüksekliği
- Asemptomatik karotis stenoza
- Sigara
- Orak hücreli anemi

b) Kesinleşmemiş faktörler

- Hiperhomosistinemi
- Sol ventrikül hipertrofisi

3- Olası risk faktörleri

- Migren
- Geçirilmiş inme öyküsü
- Oral kontraseptif kullanımı
- Alkol kullanımı
- Zararlı madde kullanımı
- Fizik inaktivite
- Obezite
- Diyet
- Hiperinsülinemi ve insülin rezistansı
- Stres
- Uyku apnesi
- Hemostatik faktörler
- Hiperürisemi
- Hipotiroidi
- Enfeksiyonlar
- Sosyoekonomik özellikler
- Mevsim ve iklim

2.5. Serebral İskeminin Etyopatogenezi

Santral sinir sisteminde oluşan iskemi, etyolojisine göre global veya fokal iskemi olarak karşımıza çıkar. Global iskemi, kardiyak arrest sonucu beyin ve spinal korda gelen kan akımının tamamen durması sonucu gelişen ağır bir tablodur. Fokal iskemi, hedef organda tek besleyici damarın oklüzyonu veya kısmi kesintisi ile olur ve oklüzyonun olduğu bölge ile sınırlıdır. Fokal iskemi, hücre içindeki enerji üreten maddeleri (kreatin fosfat, ATP) azaltarak iyon değişimini bozar ve böylece membran fonksiyonu durur. Ancak serebral fokal iskemide kollateral dolaşımdan düşük düzeylerde rezidüel kan akımı potansiyeli mevcuttur. Fokal iskemideki bu rezidüel kan akımı perfüzyon membran devamlılığını sağlayarak, geriye dönüşümsüz nöronal hasarın dönüşümüne yol açabilecek ve düşük düzeylerde metabolik aktiviteyi devam ettirecek yeterli madde gönderilmesini sağlayabilir. Santral sinir sistemi için iskemik patolojik süreçteki en önemli olay metabolik enerji ihtiyacını karşılayan oksijen ve glukoz yokluğudur (3, 5-13). Fokal iskemide lezyon; reperfüzyon hızla yapılmadığı zaman infarkt oluşan “santral fokus” ve normalde enfarktlı alanın bir parçası haline gelen “perifokal alan” olmak üzere iki bölümden oluşur. Santral fokus, dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasarı gösteren en ağır lezyon bölgesidir. Perifokal alan, elektriksel olarak sessiz, yapısal olarak ise iyon pompaları halen bozulmamış bölgedir. Kan akımı yeniden sağlanırsa veya nöroprotektif ajanlar kullanılırsa bu alanın kurtarılabilme olasılığı vardır (14).

Normal koşullarda beyin otoregülasyon ile kendini korur. İskemi sonucu dokunun işlevini yerine getiremediği durumlarda otoregülasyon mekanizması bozulur. İskemi süresi uzarsa hücre ölümü başlar. Dokunun oksijen kullanma kapasitesi düşer. Hücre membranında bulunan aktif ve pasif transport sistemleri enerji varlığında hücre fonksiyonları için gerekli olan iyon dengesini sağlar. Normal şartlarda nöronların iyon dengesini intrasellüler potasyum iyonu ile ekstrasellüler sodyum, kalsiyum ve klor iyonları sağlar. İyonik denge adenozin trifosfat gibi yüksek enerji metabolitlerine bağlı çeşitli iyonik pompalar tarafından sağlanır. Yeterli ATP sentezlenemeyeceği için iyonik pompalar görevlerini yapamaz duruma gelir. Bunun sonucunda konsantrasyon farkına bağlı olarak potasyum iyonu hücre dışına çıkarken sodyum, kalsiyum ve klor iyonları hücre içine girer. Membran depolarizasyonu oluşur. Osmotik olarak suyunda hücre içine girmesiyle birlikte sitotoksik ödem meydana gelir (2-5, 15, 16).

Serebral iskeminin fizyopatolojisinde rol oynayan temel mekanizmalar enerji kaybı, hücrel iyon dengesinin bozulması, asidoz, hücre içi kalsiyum artışı, eksitotoksiste, serbest radikallere bağlı toksisite, lipid metabolizma değişiklikleri, eksitator nörotransmitterlerin kontrolsüz salınımı, proteolitik enzimlerin aktivasyonu, nitrik oksit azalması, araşidonik asit metabolitlerinin etkileri ve sitokinlerin salınımı olarak sıralanabilir (4, 5, 10, 17).

İskemi fizyopatolojisinde rol oynayan başlıca mekanizmalar tablo 2.2.'de özetlenmiştir (24).

Tablo 2.2. İskemide rol oynayan faktörler

• Transmembran iyon pompasının bozulması • Eksitator nörotransmitter salınımı • Hücre içi kalsiyum serbestleşmesi • Reaktif oksijen ürünlerinin (serbest radikaller) ortaya çıkması • Lipid peroksidasyon ve araşidonik asit metabolitlerinin ortaya çıkması • Endotelden salınan doku plazminojen aktivatörü, selektinler, nitrik oksit gibi maddeler • Lökosit, makrofaj ve trombosit kaynaklı serbest radikaller, selektin ve integrinler, fagositik enzimler ve proinflamatuvar sitokinler • Anaerobik glikolizis • Adenozin • Kompleman sistemi • Apoptozis • İskemik tolerans (Stress proteinleri)
--

2.6. Serebral İskemi-Reperfüzyon Fizyopatolojisi

2.6.1. Transmembran iyon pompasının bozulması

İskemi sonrası gelişen anaerobik glikolizis sürecindeki yetersiz ATP üretimi , buna karşın artan enerji gereksinimi ve hızlı ATP tüketimi hücre membranında enerji bağımlı $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompasının disfonksiyonuna neden olur. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompasının disfonksiyonu

nöronun depolarizasyonuna, hücre içine kontrolsüz sodyum girişi ve potasyum çıkışına neden olur. Hücre içi Na^+ seviyesindeki yükselme ile oluşan depolarizasyon sonucu aksiyon potansiyelleri bloke olur ve kontrolsüz nörotransmitter salınımı meydana gelir. Başta glutamat olmak üzere nörotransmitterlerin geri alımı azalınca hücre içine Na^+ , Ca^{++} ve oluşan osmotik gradientle su girişi olur. Dolayısı ile intrasellüler ödem oluşur. Anaerobik glukolizis ekstrasellüler ortamda laktat birikimine neden olur. Bu serbest radikal oluşumunu potansiyelize ederken, hücre içine hidrojen iyon girişini tetikler. Ekstrasellüler ortamda laktat birikimine, artan serbest radikal toksisitesine ve asidoza neden olur. Ekstrasellüler mesafede laktik asit birikimi ile oluşan asidoz da glial hücre membranları üzerine doğrudan toksik etki yapar (9, 10, 17, 24-26).

2.6.2. Eksitatör nörotransmitter salınımı

Santral sinir sisteminde (SSS) en önemli eksitatör nörotransmitter glutamattır. Normalde presinaptik depolarizasyonla sinaptik aralığa glutamat salınımı olur. Presinaptik aralıktaki glutamat Na^+ bağımlı hücresel geri alımla (Na^+ - Ca^{++} değiştirici protein) tekrar nöronal endoplazmik retikulum ve mitokondrilerde depolanır. Astrositlerde glutamat sentetaz enzimi ile glutamine dönüştürülür ve oluşan glutamin tekrar ekstrasellüler mesafeye verilir. Daha sonra glutamin nöronlar tarafından alınır ve glutamat veya gama-amino-bitürik asite (GABA) dönüştürülür. Bu siklus iletimin sürdürülebilmesi için gereklidir. Presinaptik depolarizasyon ile sinaptik aralığa salınan glutamatın geri alınımı ATP kullanımını gerektirir. İskemide oluşan enerji yoksunluğu bu durumu bozar. Böylece ekstrasellüler mesafede biriken glutamat postsinaptik reseptörler üzerine iyon dengesini bozarak erken iskemik süreçte önemli rol oynar. SSS'nde başlıca 4 farklı glutamat reseptörü olup bunlar tablo 2.3.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Glutamat reseptörleri

Metamorfik glutamat reseptörleri	Fosfotidilinozitol döngüsü ve ikincil haberci sistemlerde rol alan reseptör grubudur
AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit) glutamat reseptörleri	Öncelikle Na^+ ve daha az olarak Ca^{++} 'un geçtiği katyon kanallarına bağlıdır. Bu kanalların normalde Mg^{++} tıkaçı ile kapalı olduğu ve AMPA reseptör aktivasyonunun Mg^{++} tıkaçını çözerek hücre içine Na^+ ve Ca^{++} girişini başlattığı düşünülmektedir
Kainate glutamat reseptörleri	Na^+ ve Ca^{++} 'un serbest olarak geçtiği katyon kanallarına bağlıdır. AMPA reseptörleri ile aynı mekanizmayı kullanarak etki gösterir
NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) glutamat reseptörleri	Hem Na^+ hem de Ca^{++} 'un serbest olarak geçtiği kimyasal katyon kanallarına bağlıdır

Glutamat reseptörlerinin uyarılması (NMDA ve non-NMDA) kimyasal ve voltaj bağımlı kanallardan hücre içine serbest kalsiyum girişini başlatır. Hücre içi Ca^{++} seviyelerindeki artış Calpain'lerin (Calcium activated neutral proteases), proteazların ve fosfatazların aktivasyonuna ve erken gen ekspresyonuna yol açarak nöronal hasarı tetikler. Glutamat eksitotoksitesini engellemek için üzerinde çalışılan başlıca NMDA reseptör antagonistleri arasında dekstrometorfan, ketamin, amantadin, fensiklidin ve MK-801 sayılabilir. Santral sinir sisteminde özellikle eksitator aminoasit reseptörlerinden zengin bazı bölgelerin (hipokampus, striatum, talamus, serebral ve serebellar korteks) hipoksi ve iskemide diğer bölgelere göre daha hassas olduğu, özellikle epileptik nöbetler sırasında veya hafif iskemide bu bölgelerde iskemik zincirin ileri derecede aktive olarak ciddi doku hasarı geliştirdiği bilinmektedir. Klinikte bu fenomen selektif duyarlılık olarak isimlendirilir ve selektif duyarlılığa neden olan temel faktörün bu bölgelerdeki eksitator aminoasit (glutamat) yoğunluğu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda NMDA reseptörleri üzerinden oluşan iskemik hasar sürecinde nöronal ölümün 24 saatten sonraki geç fazda olduğu gösterilmiştir. Akut nöronal hasarın non-NMDA reseptörleri üzerinden hücre içine ani Na^+ ve su geçişi ile olduğu ve hücrenin osmotik yıkımına yol açan intrasellüler ödemin önlenmesi ile hasarın engellenebileceği bildirilmiştir (9, 10, 17, 24, 27-33, 158).

2.6.3. Hücre içi kalsiyum serbestleşmesi

Hücre içinde 100nMol kadar düşük konsantrasyonda bulunur ve ekstrasellüler kalsiyuma göre 10^4 kat daha azdır. Hücre içi kalsiyum çok sıkı denetlenir ve Ca^{++} hücrede; hücre membranı, endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve nükleusta depolanır. Hücre içi kontrolsüz Ca^{++} artışı iskemik hasarın başlangıcından itibaren akut evrede gözlenen en önemli değişiklik olup, hücre içine NMDA ve non-NMDA glutamat reseptörleri tarafından aktive edilen kimyasal kanallar ve depolarizasyonla aktive olan voltaj bağımlı kanallardan geçerek girer. Genel olarak kalsiyum kanal blokörleri vasküler tonus üzerinde etkilidir. Dihidroksipiridin türevleri (nimodipine ve nicardipine) subaraknoid kanama sonrası gelişen vazospazmin tedavisinde kullanılmaktadır. Nimodipine nöronal kalsiyum kanallarına yüksek affinite göstererek %32 rölatif ve %5,1 absolud yük sağlar. Bir dereceye kadar selektif serebral vazodilatasyona neden olur (4, 6, 17, 24, 34, 35).

2.6.4. Reaktif oksijen ürünlerinin (Serbest radikaller) ortaya çıkması

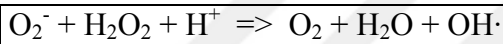
Atomlar en dış yörüngelerinde daima çift sayıda elektron bulundurma eğilimindedirler. En dış yörüngesinde tek sayılı elektron içeren atom ya da moleküllere serbest radikal adı verilir. Katalitik reaksiyonlar sırasında ara ürün olarak oluşurlar. Serbest radikaller molekülün yapısına göre oksijen merkezli (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri), karbon merkezli (karbontetraklorür, triklormetal, aromatik hidrokarbonlar) ve sülfür merkezli (glutasyon) olabilir. Normal fizyolojik şartlarda mitokondrial elektron transport zincirinde düşük oranda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşur. Bu radikaller glutasyon, vitamin C, vitamin E gibi normal savunma sistemindeki antioksidanlarca ve glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzimatik korunma mekanizmaları ile yok edilirler. Serbest radikallerin başlıca biyolojik hedefleri arasında proteinler, nükleik asitler ve DNA, karbonhidratlar, membran fosfolipidleri sayılabilir. Oluşan serbest radikaller hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken, ekstrasellüler mesafeye de geçer ve uzak etkilerini oluştururlar. Serbest radikallerin etkinliğini çözünürlüğü kadar dokudaki diffüzyon hızı da belirler. En potent serbest radikal hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikalidir. Fe^{++} ve Cu^{++} gibi transizyonel metallerin varlığında hidrojen peroksit radikalinden (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalinden Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları (Tablo 2.4 ve Tablo 2.5) sonucu oluşur. Serbest radikallerin bir çok hücre içi kaynağı vardır. Bunlar şu şekilde özetlenebilir; indirgenmiş flavinler, tiyoller, epinefrin ve antibiyotikler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu, iki bağlı metaller, ksantin oksidaz

gibi hücrel enzim ve proteinler üzerinden, iskemi gibi yetersiz oksijenli durumlarda mitokondrial elektron transport zincir dönüşümünün olmaması, ürat oksidaz ve yağ açıl CoA oksidaz gibi peroksizomal oksidan enzimlerin direkt H_2O_2 oluşturmaları, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan arasıdonik asit yıkım ürünlerinden serbest oksijen radikali oluşması, fagozomlar ve myeloperoksidaz üzerinden granülosit aktivasyonu ile serbest O_2 radikalleri oluşumu; NO, NO_2 , ozon, tütün, karbontetraklorür, ilaçlar gibi zenobiyotiklerin otooksidasyonu ile serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri doymamış yağ asitleri ile lipid peroksidazları, fosfolipidler üzerinden prostoglandin, lökotrienler gibi arasıdonik asit metabolitleri ve ikincil haberci sistem üzerinden proinflatuar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF- α) oluşumuna yol açarak inflamatuvar süreci başlatır (24, 36-44, 137, 138).

Tablo 2.4. Fenton reaksiyonu



Tablo 2.5. Haber-Weiss reaksiyonu



2.6.5. Lipid peroksidasyon ve arasıdonik asit metabolitlerinin ortaya çıkması

Serbest yağ asitlerinin salınım ve oksidasyonu, temel hücrel mekanizmaların düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Fosfolipidler yönünden çok zengin bir ortam olan SSS'nde iskemi ve diğer tüm travma modellerinde serbest yağ asitleri zamana bağlı olarak artış gösterirler. Fokal veya global iskemi sonrası erken dönemde ortaya çıkan yağ asitleri arasında özellikle stearik asit (18:0), arasıdonik asit (20:4), palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1) ve dokosaheksanoik asit başlıca ürünlerdir. Hidrofobik özellikleri nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda deterjan benzeri etki gösterirler. Böylece membran fonksiyonlarının bozulmasına ve membran sıvı içeriğinin değişmesine neden olur. Arasıdonik asit ve dokosaheksanoik asit esansiyel yağ asitlerinden temin edilirler. Serbest poliansatüre yağ asitleri mitokondrial membranda oksidatif fosforilasyonu bozarlar. Serbest yağ asitleri eikonozoidlere dönüşerek vazokonstrüksiyon, vazodilatasyon, vasküler geçirgenliğin artışı, platelet agregasyonu ve lökosit adezyonunun tetiklenmesi gibi hücrel

değişiklikler oluşturular. Enzimler ve iyon kanallarına doğrudan etki ile iskemik sürecin ilerlemesine neden olurlar (24, 46, 50, 51).

Araşidonik asit; siklooksijenaz, lipooksijenaz ve sitokrom P-450 monooksijenaz enzimleri ile üç ana biyosentetik yol üzerinden metabolitlerine dönüşerek etki eder. Araşidonik asit zincirini başlatan fosfolipazlar; fosfolipaz A-2 (membran bağımlı sitozolik tip-1 ve sekretuvar tip-2), fosfolipaz C, fosfolipaz D iskemide aktif hale gelirler.

Siklooksijenaz yolu: Bu yolda oluşan prostoglandin D (PGD), prostoglandin E (PGE), prostoglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$), prostoglandin I $_2$ (PGI $_2$) ve tromboksan A $_2$ (TxA $_2$) prostanoidler olarak bilinir. G proteinleri tarafından yönlendirilip hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile etkilerini gösterirler.

Lipooksijenaz yolu ve lökotrienler: Araşidonik asitten 5-lipooksijenaz enziminin etkisiyle oluşan lipoksinler serbest radikal oluşumu ve nötrofil degranülasyonu üzerinde çok önemli rol oynarlar. Lökotrien A $_4$ (LTA $_4$) instabil ara ürün olup süratle Lökotrien B $_4$ (LTB $_4$)'e dönüşür. LTB $_4$ kemotaksik bir ajandır. Lökositlerin uyarılmasında ve fagositozunda rol oynar. LTA $_4$ sülfopeptidaz etkisiyle sülfopeptidil lökotrienlere [Lökotrien C $_4$ (LTC $_4$), Lökotrien D $_4$ (LTD $_4$), Lökotrien E $_4$ (LTE $_4$)] dönüşür. Bunlar hipersensitivite reaksiyonlarının en önemli yönlendiricileri olup mikrodolaşımda geçirgenliği arttırmırlar.

Sitokrom P-450 monooksijenaz yolu: Araşidonik asitten platelet aktive edici faktör (PAF) oluşumunu sağlar. PAF endotel, lökosit ve makrofaj gibi hücrelerde yapılır ve salınır. Nöron ve glia gibi membran fosfolipid yapısından zengin hemen tüm hücrelerde endojen olarak sentezlenir. İskemide biyoaktif lipid yapısındaki PAF sentezi ileri derecede artar. PAF sentezinde terminal enzim olan kolin fosfotransferaz asetikolin ve dopamin gibi nörotransmitterler ve proteinkinaz-C aktivatörleri tarafından uyarılarak PAF yapımını arttırmırlar. Kolin fosfotransferaz aktivasyonu ortamdaki iyonize kalsiyum tarafından baskılanır ve bunun neticesinde PAF yapımı azalır. PAF hem inflamatuvar cevabı yönlendirerek hem de eksitator nörotransmitter salınımını presinaptik mekanizmayla uyararak iskemik beyin hasarında önemli rol oynar (24, 45-52).

2.6.6. İskemide endotel ve lökositlerin rolü:

Endotel kaynaklı selektinler, doku plazminojen aktivatörü (TPA), nikrik oksit; lökosit, makrofaj ve trombosit kaynaklı selektinler, integrinler, fagositik enzimler ve proinflamatuvar sitokinler serebral iskemide önemli rol oynar. Lökositlerin adezyon ve aktivasyonunda proinflamatuvar sitokinler önemlidir (24, 42).

Sitokinler; interlökinler (IL), replikasyon faktörleri, granülosit monosit-koloni stimulan faktör (GM-CSF, GCSF), interferonlar, Tümör Nekrozis Faktör (TNF) olup inflamatuvar süreçte rol oynarlar. Özellikle IL-1 β , TNF α , IL6 gibi proinflamatuvar sitokinler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır (59).

İnterlökin-1 (IL-1): Alfa ve beta olarak iki gruba ayrılır. İnsanlarda ikinci kromozomda bulunur. Serin proteazlarca protolitik bölünme ile oluşur. IL-1, inflamasyondaki rolü ve endotel aktivasyonuna ek olarak hematopoezis, yara iyileşmesi, proteoliz gibi olaylarda da görev alır. Natural Killer Cell (NK) aktivasyonunun artırılması, fibroblastlardan IL-6 yapımının uyarılması, T hücrelerinden IL-10 üretiminin baskılanması, adezyon moleküllerinin salınımı, prostoglandin-E yapımının uyarılması, nötrofillerin fagositik aktivitesinin artırılması ve transendotelial geçişin kolaylaştırılması, akut faz reaktanlarının sentezinin uyarılması, eozinofil ve makrofajlarda tümör hücrelerine karşı sitotoksitenin artırılması, fibroblastlardan ICAM-1 (İntrastoplazmik Sellüler Adezyon Molekülü-1) yapımı ve kontrolü, EGF (Endotelial Growth Faktör) reseptör salınımının düzenlenmesi başlıca fonksiyonlarıdır (54).

İnterlökin-6 (IL-6): Akut inflamatuvar cevapta ve konak defansında önemli rol oynar. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar aktivitelerinin her ikisini de uyarır. B hücrelerinin immünglobulin salınımı için kofaktör rolü, karsinoma, B hücreli lösemi ve lenfoma hücrelerinin gelişmesini inhibe eden T hücreleri için mitozu önleyici etki, hipofizden ACTH ve sürrenallerden glukokortikosteroidlerin salınımı, normal hematopoetik prekürsörler ve myelomonositik hücreler için farklılaştırıcı faktör görevi, hepatositlerden akut faz reaktanlarının salınması bilinen fonksiyonlarıdır (55-57).

Tümör Nekrozis Faktör (TNF α): Her biri 157 aminoasit yapısındaki non-kovalent bağlarla bağlanmış üç üniteden oluşur. Monositler, astrositler, makrofajlar ve mikroglialar gibi bir

çok hücreden salınımı olur. IL-1 ile sinerjistik etki, transkripsiyon sırasında lipoprotein lipaz baskılanması, Class MHC1 antijenlerinin indüksiyonu, GM-CSF ve IL-1'in sentez ve salınımı, lökosit adezyonunun uyarılması, PAF salınımı önemli fonksiyonlarıdır (58).

İskemide Endotelin Rolü: Endotel hemostazis ve inflamasyonda mikrodolaşımı düzenleyen en önemli unsurlardan biridir. Normal koşullarda endotel kan akımına karşı aktif antitrombotik ve antiinflamatuvar yüzey sağlayarak akımın kesintisiz sürdürülmesini sağlar. Kanın pıhtılaşmasını engelleyen başlıca mekanizmalar endotel yüzeyindeki trombomodulin, protein-C ve protein-S sistemleri olup, yüzeydeki trombomodulin trombine bağlanarak onun fibrinojene dönüşümünü engeller. Trombomodulin-trombin kompleksi protein-C'yi aktive ederek endotel hücre yüzeyine ve protein-S yoluyla diğer membranlara bağlanarak faktör-5, faktör-8 ve PAI-1 (Plazminojen aktivatör inhibitörü-1) oluşumunu baskılar. Bunun yanı sıra endotel yüzeyinde yer alan faktör 7 ve faktör 10 (Doku faktörü) aktivitelerini baskılayan doku faktör yolu inhibitörü (TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor) ve heparin benzeri molekül (glikozaminoglikan-sülfat kompleksleri) pıhtılaşmanın önlenmesinde rol alan önemli endotelial komponentlerdir (60, 61). Endotelden salınan doku plazminojen aktivatörü serin merkezli proteaz olup arjinin-valin bağını parçalayarak plazminojeni aktive eder (62). Prostosiklin membran etkileşimlerinde ortaya çıkan potent bir vazodilatör ve bilinen en etkili platelet agregasyon inhibitörüdür (24). Endotel yüzeyinde yeralan adenosin difosfat enzim platelet agregasyonunu potansiyel olarak yönlendiren adenosin difosfat 5-nükleotidaz enzimi ile önce adenosin monofosfat ve daha sonra adenosine dönüştürür. Oluşan serbest adenosin, difosfat yapısının aksine platelet agregasyonunu baskılar ve vazodilatasyona neden olur. Adenosin aynı zamanda aktif nötrofillerin endotel yüzeyine adezyonunu da baskılayarak kuvvetli antiinflamatuvar etki gösterir (42).

Endotelin iskemide ve reperfüzyondaki en önemli özelliği protrombotik-proinflamatuvar (Pıhtılaşma ve inflamasyonu kolaylaştırıcı) etkisidir. Normal şartlarda endotelden salınmayan fakat hasar durumunda ekstremsel koagülasyon yolunun tetikleyicisi TF (Tissue Factor) salınımı TNF- α , IL-1, trombin ve lipopolisakkaritlerce uyarılır. Protrombin aktivasyonu için en önemli yüzey, endotel hücreleri olup IL-1'in de önemli kaynağı ve hedefidirler (63-66). TNF- α tarafından da sentezi uyarılan IL-1, TF salınımını etkileyerek PAF oluşumunu artırırlar. PAF, platelet agregasyonunu ve lökosit adezyonunu yükseltir.

Vazokonstrüksiyona ve IL-1, TNF- α yapımını arttıran makrofaj aktivasyonuna sebep olur (67, 68). Oluşan IL-1 protein-S'in membrana bağlanmasını inhibe eder. Trombomodulin protein-C-S kompleksini bloke eder, TPA yapımını azaltır ve fibrinolizisi baskılar. Aynı zamanda endotel hücrelerinden lökosit ve platelet bağlayan adezyon molekül salınımını arttırır. Hasar durumunda endotel hücrelerindeki 5-lipooksijenaz sisteminin aktivasyonu ile oluşan lökotrienler lökosit kemotaksisini arttırıp vazokonstrüksiyona neden olurlar (69-72).

İskemi-Reperfüzyon sürecinde endotel hücrelerinde ksantin oksidaz-siklooksijenaz reaksiyonları ile süperoksit anyonu oluştururlar. Endotelinin üç izoformu (ET-1, ET-2, ET-3) olup, süperoksit anyonu, TxA₂ gibi endoperoksitlerle vazokonstrüksiyona neden olurken yine endotelden salınan nitrik oksit (NO), prostasiklin gibi mediatörler de vazodilatasyona yol açarlar. Bu da vazomotor kontrolü sağlar. Endotelyal nitrik oksit sentetaz (e NOS) (NOS izoform III) kalsiyum-kalmodülün bağımlı enzim olup platelet-lökosit adezyonunu baskılar (73-75). Endotelinler 21 aminoasitli (AA) izopeptidler olup çok farklı biyolojik etkilere sahiptir. Trombosit agregasyonu, makrofaj infiltrasyonu, aterosklerozis, trombin, IL-1, TNF-alfa, TGF-beta (Transforming growth faktör-beta) , hipoksi ve vazoaktif peptidler endotelin salınımına neden olurlar. Endotelin-1 (ET-1) memelilerdeki en potent vazokonstrüktör olup, endotelinler aynı zamanda ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) ve VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) ileri kontrolünü ve endotel hücrelerinden salınımını arttırırlar. İskemi-reperfüzyon hasarında endotel hücresi içinde nöron ve astrositlere benzer şekilde ileri derecede iyonize kalsiyum birikimi olur. Bu endotel hasarını ve fonksiyon bozukluğunu tetikleyen en önemli unsurlardan birisidir. Hücre içi kalsiyum artışında süperoksit ve peroksinitritlerin de toksik etki ile rol aldığına dair bulgular elde edilmiştir (76-79).

İskemi-reperfüzyon hasarında iskemik doku içinde lökosit infiltrasyonu ile birlikte aktivasyonunda artış olması, nötropenik koşullarda enfarkt alanının ve hacminin eşlik eden ödemle birlikte azalması, özellikle fokal iskemi-reperfüzyon modellerinde lökosit infiltrasyonunun artması ile kapiller dolaşımda P-selektin ve ICAM-1 salınımının artması endotel lökosit etkileşiminin iskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını desteklemektedir (80-83).

Dolaşımdaki lökositlerin endotel duvarına tutunması bir dizi tamamlayıcı reseptör ve sinyal moleküllerinin işbirliğini gerektiren kompleks bir süreçtir. Lökositlerle endotel

hücreleri arasındaki adeziv ilişkileri yönlendiren üç grup adezyon molekülü vardır. Hücreler arası ortamdan gelen sinyalleri hücre mimarisine entegre ettiği düşünülen heterodimerik moleküller olan integrinler, integrinleri tanıyarak etkileşen immünglobulinler ve karbonhidrat bağlarını tanıyarak etkileşen selektinler en önemli adezyon molekülleridir (24).

İmmünglobulin yapısındaki hücresel adezyon molekülleri içinde özellikle dört tip molekül ön planda yer alır. Bunlar ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 ve CD31 (PECAM-1, endoCAM)'dir. ICAM-1 tüm vasküler segmentlerde endotel hücrelerinden düşük seviyelerde ve sürekli olarak salınır. Salınımı sitokinlerce üst düzeyde kontrol edilir. Maksimum salınımına 16-24 saatte ulaşır. Yüksek konsantrasyonu yaklaşık 72 saat sürer. ICAM-2 ise inaktif endotel hücrelerinden sürekli olarak ve ICAM-1'e göre yaklaşık 10 defa daha fazla salınır. ICAM-1 ve ICAM-2 organizmada birçok hücre tarafından sentezlenir. VCAM-1 inaktif endotel hücrelerinden çok düşük düzeylerde salınır. Ortamda bulunan proinflatuar sitokinler VCAM-1 salınımını ileri derecede arttırarak 6-12 saatte maksimum düzeye çıkmasına neden olurlar. VCAM-1 aynı zamanda makrofajlar, kemik iliği stroması, renal tübüler epitel hücreleri, lenfoid dentritik hücreler ve sinoviyal hücrelerde de yapılır (3, 24, 35, 57, 85-87).

CD31 endotel hücreleri, plateletler, nötrofiller, monosit ve lenfositlerden salınır. İki endotel hücresi arasındaki sınır bölgede her ikisi de endotel kaynaklı iki CD31 molekülü birbiriyle homofilik adezyon oluşturarak vasküler permeabiliteyi sınırlar. Biri endotel, diğeri lökosit kaynaklı iki CD31 molekülü arasındaki etkileşim lökositlerin dolaşımdan dokuya (transendotelyal) migrasyonunu kolaylaştırır. CD18 grubu (beta-integrinler) üç alfa alt ünitesinden birinin ortak bir beta alt grubuna nonkovalen bağla bağlanmasından oluşan ve hemen daima lökositler tarafından ve sürekli olarak ortama salınan spesifik adezyon molekülleridir (24, 88).

Lökositlerin dolaşımdan ayrılarak doku içine geçişi üç temel aşamadan oluşur. Birinci aşama lökositlerin kendi etrafında hasarlı damar segmenti boyunca yuvarlanma (rolling) aşaması olup selektinler tarafından yönlendirilir. Kan akımı ile serbestçe hareket eden lökositler inflamasyon veya iskelemlle aktive olan endotel yüzeyine yaklaşarak ilk teması oluşturur ve yuvarlanarak vasküler segment üzerinde kan akımından ayrılacağı yere gelir. İkinci aşamada lökosit endotel üzerine yığılır ve adezyon güçlendirilir. Endotel hücre

membranındaki interstoplazmik adezyon moleküllerine (ICAM-1 ve ICAM-2) bağlanan ve lökositlerde bulunan CD18 grubu adezyon molekülleri tarafından yönetilir. Üçüncü aşamada lökositler dolaşım dışına çıkar. Vasküler endotel üzerindeki interstoplazmik adezyon molekülleriyle etkileşen CD18 grubu integrinlerle yönetilir. Lökositler ICAM-CD18 etkileşimiyle endotel hücreleri arasından dolaşımdan dokuya geçerler. Endotel aktivasyonu ile plateletler ve lökositler R-selektin, CD31, glikoproteinIIb, IIIa gibi platelet adezyon reseptörleri yardımıyla endotel segmenti üzerinde toplanırlar (84, 89, 90).

2.6.7. İskemide nitrik oksit (NO) rolü

Nitrik oksit, nitrik oksit sentetaz enzimi (NOS) ile sentezlenir. Nöronal ve endotelial nitrik oksit sentetaz kalsiyum bağımlı izoformlar olup aktivasyonları için serbest kalsiyuma gerek duyarlar. Buna karşın inducible nitrik oksit sentetaz kalsiyum bağımlı değildir. Endotoksin ve proinflatuar sitokinlerce aktive edilir. SSS iskemisi sırasında nitrik oksit salınımı iki farklı zamanda pik yapar. Birinci pik hemen iskeminin başında olup nöronal ve endotelial nitrik oksit sentetaz tarafından indüklenir. İkinci pik iskemiden 1-2 saat sonra başlar ve ağırlıklı olarak inducible NOS tarafından oluşturulur. Endotel kökenli NO, vazodilatör etkisine ek olarak platelet akümülyasyonunu, platelet ve lökositlerin adezyonunu baskılar. Nitrik oksit, lökosit adezyonunu ICAM-1, VCAM-1, P-selektin gibi adezyon moleküllerini inhibe ederek baskılar. Kan akımını arttırarak hasarı geciktirir. İntrasellüler kalsiyum artışı, NMDA reseptör aktivasyonu, kalmodulin agonistleri endotel ve nöronal kaynaklı nitrik oksit salınımını, proinflatuar sitokinler ise inducible NOS kaynaklı nitrik oksit salınımını arttırırlar. Kalmodulin antagonistleri ve kalmodulini bağlayan maddeler (gangliozide) nitrik oksit salınımını azaltırlar (24, 92, 93).

2.6.8. Anaerobik glukolizis

Anaerobik glukolizis ekstrasellüler ortamda laktat birikimine neden olur. Bu serbest radikal oluşumunu potansiyelize ederken, hücre içine hidrojen iyon girişini tetikler. İntrasellüler asidoz oluşur. İskeminin varlığında hiperglisemi anaerobik glukolizisi arttıran önemli bir faktördür. Ekstrasellüler ortamda laktat birikimine, artan serbest radikal toksisitesine ve asidoza neden olur. Hipergliseminin insülinle nötralize edilmesi iskemide nöroprotektif etki göstermektedir (24).

2.6.9. İskemide adenozinin rolü

Adenozin SSS'nde yer alan inhibitör bir nöromodulatördür. Beyin iskemisi ve reperfüzyonu sırasında yüksek enerjili fosfat bağları (ATP, ADP, AMP) hidrolize olarak ortamda adenozinin artmasına neden olurlar. Adenozin potent bir vazodilatatör olup, parsiyel oksijen basıncı 50 mmHg'nın altına düştüğünde gelişen derin vazodilatasyonda primer rol oynar. Adenozin nöroprotektif olup, başlıca etkileri arasında vazodilatasyon ve buna bağlı lokal kan akımında artma, nötrofil akümülyasyonu, adezyonu, transmigrasyonu ve degranülasyonunda inhibisyon, endotel hücresinin yapısal bütünlüğünün korunması sayılabilir (24, 91, 99).

2.6.10. İskemide kompleman sisteminin rolü

İskemi-reperfüzyon sırasında kompleman sistemi aktive olarak anaflatoksinler (C3a, C4a, C5a) ve terminal kompleman kompleksi oluşur. Doğrudan hücre permeabilitesini arttırarak histamin ve PAF salınımını, C5a üzerinden lökosit adezyonunu ve süperoksit radikal oluşumunu tetikleyerek ileri hücre hasarına neden olurlar (24, 94).

2.6.11. İskemik tolerans (Stress proteinleri)

İskemik tolerans, hafif ve kalıcı hasar oluşturmeyen subletal stimulusa yanıt olarak hücre içi fosforilasyon ve protein sentezinin etkilenmesi ile bir dizi gen ekspresyonu ve takip eden protein sentezi yoluyla 24-72 saat içinde uygulanacak ikinci ancak ciddi bir uyarıya karşı nöroprotektif etki oluşumu olarak tanımlanır. İlk olarak vücut ısısında subletal yükselme ile oluşan heat-shock proteinlerinin (HSP) yüksek ısıya karşı ilk 24-72 saat içinde iskemik tolerans oluşturduğu saptanmış. İskemik tolerans özellikle selektif duyarlılık gösteren eksitatör aminoasitlerden zengin bölgelerde daha belirgindir (amigdala, hipokampus, korpus striatum, hipotalamus, talamus ve korteks). Hipoksi ve iskemi ile stres proteinleri salınımı olur. HSP ve ubiquitin bunların başlıcalarıdır. Bir flavonoid olan quercetin ve hsp72 antikorları stres proteinlerini kısmen baskılar. İskemik tolerans süperoksit dismutaz (SOD) immünreaktivitesini azaltır (5, 24, 57, 95-97).

2.6.12. Apoptozis

Apoptozis programlanmış hücre ölümüdür. Embriyogenezis, hücresel hemostazis ve immün sistem maturasyonu için gerekli bir süreçtir. Bu nöronlar SSS'nde kalıcı olarak

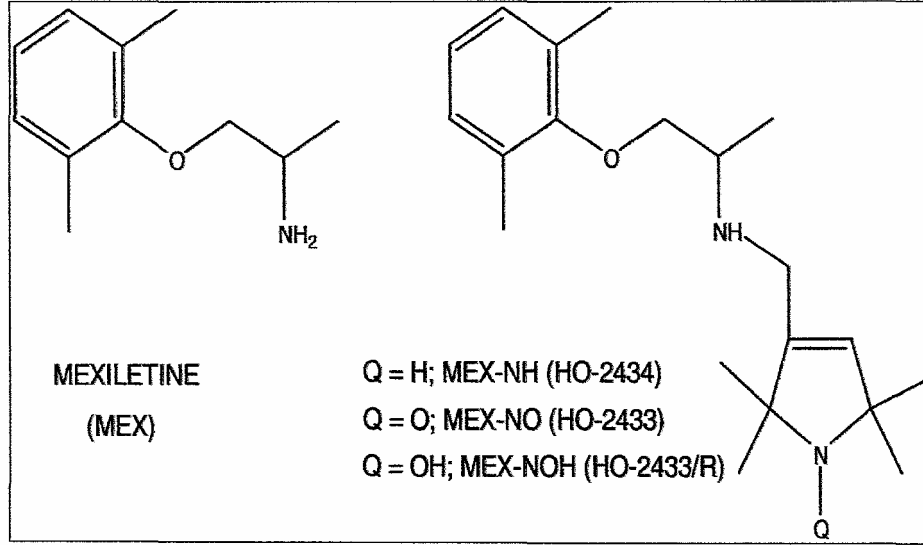
yerleşirken kalanlar apoptoz ile ortamdan uzaklaştırılır. Oksidatif stres, kalsiyum toksisitesi, eksitotoksiste, iskemiyle apoptotik yolların aktive olması nöronal hücre ölümünü hızlandırır. Apoptozis iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşama indüksiyon dönemi olup özgün stimulus ile uyarım sonucu oluşur. İkinci aşama etkin süreç (effektör) olup apoptoz için gerekli substratların ortama çıkmasıyla mitokondriyal permeabilite artışı, hücre içi kalsiyum artışı, kaspazlar ve diğer kalsiyum bağımlı enzimlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Sitoplazmik ve nükleer modifikasyonu takiben hücre fragmente olur ve apoptotik cisimcikler çevre hücreler ve makrofajlarla fagosit edilir (5, 24, 98).

2.7. Meksiletinin Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Meksiletin kimyasal olarak 1- (2,6-dimethylphenoxy)-2-aminopropane yapısındadır. Class I-b antiaritmik bir ilaçtır ve voltaj duyarlı Na^+ kanallarını bloke ederler. Sodyum kanallarına hızla bağlanıp hızla ayrılırlar. Aksiyon potansiyeli süresini kısaltırlar. Lokal anestezi bir madde olan lidokain analogudur. Meksiletinin terapötik penceresi dar olduğundan serum konsantrasyonunun takibi gereklidir. Terapötik plazma seviyesi 0,5-2,0µg/ml'dir. Meksiletin potent antioksidan, kalsiyum kanal blokörü, ATP sensitif potasyum kanal aktivatörü ve sodyum kanal blokörüdür. ATP sensitif potasyum kanal aktivasyonu kalp kası, iskelet kası, nöronlar ve pankreasta hücrel fonksiyonların regülasyonunda önemli rol oynar (100-102, 104-106, 115).

Akut başlangıçlı veya kronik süreçli ventriküler aritmilerin tedavisinde kullanılır. Fakat konjenital paramyotoni, hiperkalemik periyodik paralizi, potasyum ağırlıklı myotoni, uzun QT-3 sendromu ve nöropatik ağrı da etkindir (100, 102).

Meksiletinin kimyasal yapısı şekil 2.1'de görüldüğü gibidir (102, 103).



Şekil 2.1. Meksiletin ve oksidatif metabolitlerinin kimyasal yapısı

Meksiletin yüksek derecede hidrofobik bir bileşiktir ve bir polar grubu (NH_2 grubu) vardır. Aromatik halkaya yerleşmiş olan metil grubu iki katlı lipid tabakasına yapışır. Bu yapışma sonucunda amino grubu su fazı ile etkileşir. Su ortamında bulunan serbest hidroksil grubuna bağlanarak serbest radikalleri tutar ve lipid peroksidasyonun ilerleyişini bloke eder. Glutasyon, α -tokoferol (vitamin E), askorbik asit gibi antioksidanlar santral sinir sisteminde çok miktarda bulunmaktadır. Bu antioksidanların serbest radikalleri tutucu özelliği ile nöroprotektif etkili olduğu ileri sürülmüştür. Meksiletinin etki mekanizması da α -tokoferolün etki mekanizmasına benzemektedir (114, 140).

Meksiletin primer bir amindir ve bu ilacın pKa değeri 8,4'tür. Bu bileşik fizyolojik pH değerlerinde hem nötral hem de pozitif değerde bulunabilir. İlacın yüklü formu asidik koşullarda artmaktadır. Bu da ilacı daha potent hale getirir. Çünkü anoksik koşullarda açılmış olan Na^+ kanalları bloke olmaktadır. Bu sayede anoksik denge engellenmektedir. Meksiletin kan dolaşımına absorbe olur. Kan-beyin bariyerini yeterince yüksek konsantrasyona ulaşacak şekilde geçer. Böylece fokal iskemi-reperfüzyon hasarında beyni koruyucu etki gösterir (149).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Başkent Üniversitesi Etik Kurulu ve Araştırma Kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallara ve prosedürlere uygun olarak onay alındıktan sonra 12.04.2005 tarih, 2005/AP-453 sayı ve DA03/17 proje numarası ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

Bu çalışmada ağırlıkları 285-425 gram arasında olan 30 adet erkek erişkin Sprague-Dawley ırkından rat kullanıldı. Östrojenin nöroprotektif etkisi bir çok çalışmada gösterildiği için çalışmamızda dişi rat kullanılmadı (151-153, 155). Ortalama ağırlıkları 338 gramdı. Deneyde mikrosürüj aletleri, normal cerrahi aletler ve cerrahi mikroskop (Resim 3.1) kullanıldı.



Resim 3.1. Kullanılan cerrahi mikroskop ve cerrahi alan

3.1.1. Deney Grupları

- I. Grup: Sadece iskemi (n: 10 adet)
- II. Grup: İskemi ve sham (normal salin) tedavisi (n:10 adet)
- III. Grup: İskemi ve meksiletin tedavisi (n:10 adet)

3.1.2. Meksiletinin ve normal salinin deneyde kullanılması

Mexiletine hydrochloride (Mexitil Ampoules 25mg/ml Solution for Injection and Infusion, Boehringer Ingelheim, Germany) 250mg'lık 10ml'lik ampuller halinde deneyde hazır bulundu. Meksiletin tedavi grubundaki ratlara 60mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p) olarak verildi. Yine sham grubuna 1ml/kg normal salin intraperitoneal olarak verildi. İskemi grubuna herhangi bir madde verilmedi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Anestezi

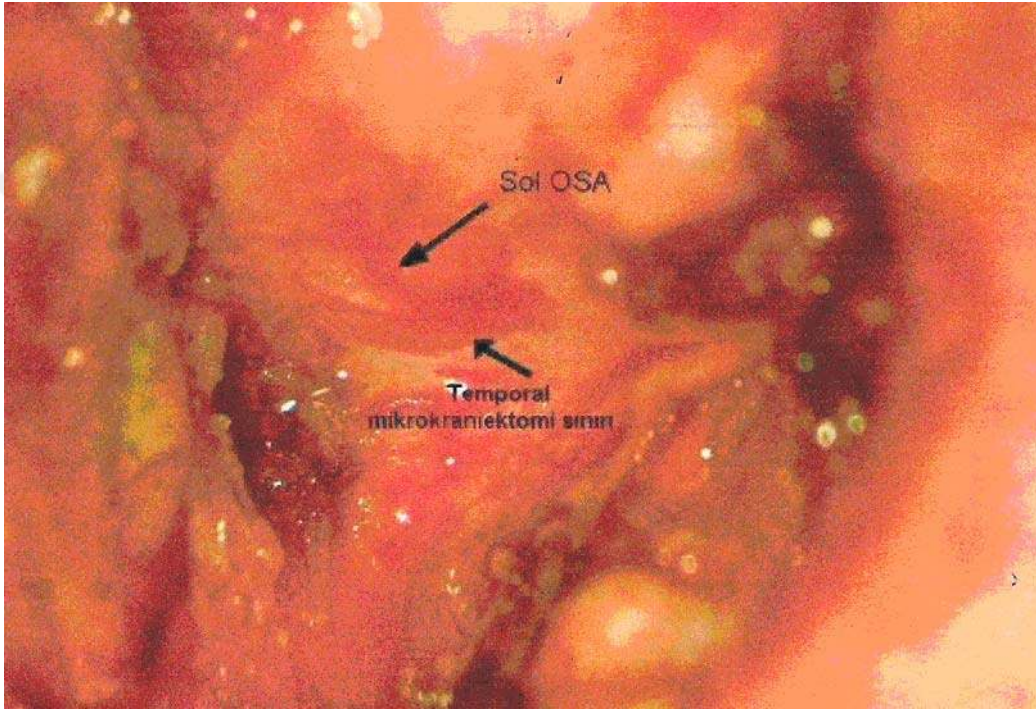
Çalışmada kullanılan bütün ratlar bir saat önceden aç bırakıldı. İntraperitoneal olarak verilen 60mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 9mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul) ile anestezi sağlandı. Anestezi, ratlar ağrıya yanıtız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlandı.

3.2.2. Cerrahi İşlem

Cerrahi işlem sırasında antisepsi kurallarına uyuldu. Hayvanların vücut ısıları rektal termometre ile takip edildi ve operasyon süresince 37°C civarında tutulmaya çalışıldı. İskemiden hemen önce ve sonra olmak üzere toplam iki defa her bir rata arteriyel kan gazı bakıldı. Postoperatif ratlar normal oda ısısında (20-22°C) tutuldu.

Anesteziden sonra ameliyat masasına yatırılarak polivinil pirolidon iyod (Drogsan, Ankara) ile lokal antisepsi uygulandı. Ratların önce supin pozisyonda cerrahi mikroskop (OPML – 9 FC Zeiss, Germany) altında orta hat boyun insizyonları yapıldı. Her iki karotid arter bulunarak 4/0 ipek sütür yardımı ile askıya alındı. Sağ femoral arter, arter kan gazı bakılmak üzere kataterize edildi. Daha sonra sağ yan yatar pozisyonda sol zigomatik cilt

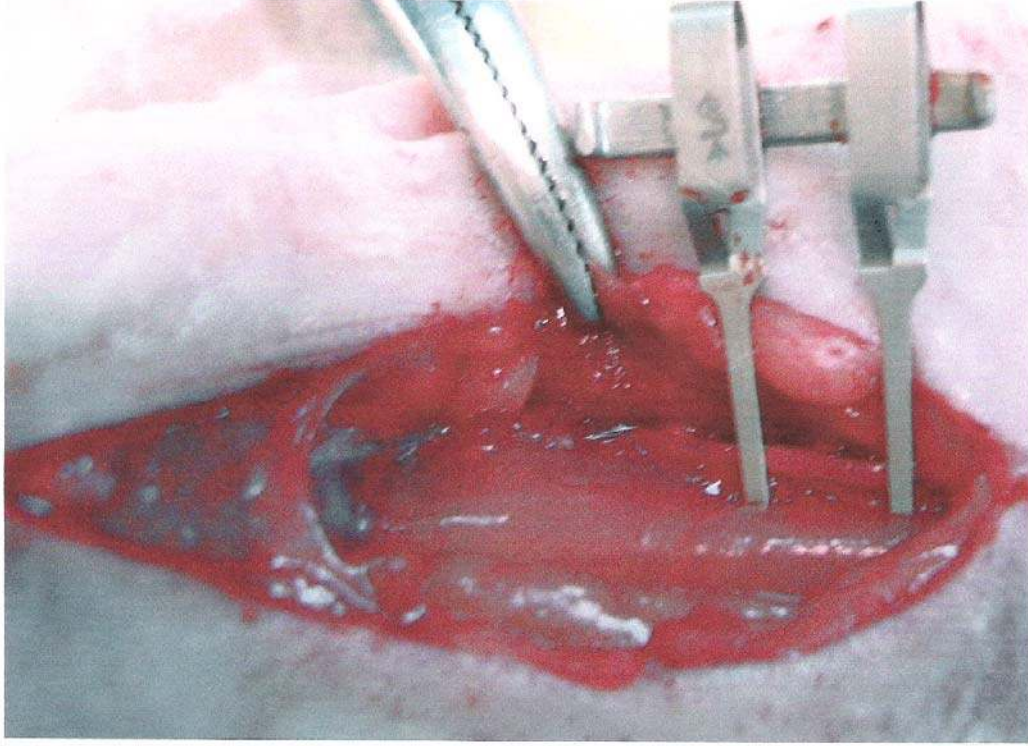
insizyonu ile ratların sol temporal kemikleri ortaya çıkarıldı. Elektrikli dril yardımıyla yapılan mikrokraniektomiye takiben dura ve araknoidleri açılarak sol orta serebral arterleri görüldü (Resim 3.2). Orta serebral arter bipolar yardımı ile koagüle edildi ve eş zamanlı olarak her iki karotid arteri de geçici olarak mikroklipte kapatıldı (Resim3.3). Ratlar 60dk boyunca serebral iskekiye bırakıldı. 60dk sonunda karotid arterler açılarak boyun, femoral ve kraniektomi insizyonları 3/0 ipek suture ile dikildi. İşlem sonrasında ratlara meksiletin ya da normal salin verilerek postoperatif bakım için kafeslerine koyuldu.



Resim 3.2. Ratlarda sol temporal mikrokraniektomi sonrası sol orta serebral arter

Postoperatif 24. saatte ratlar intrakardiyak perfüzyona alındı. Perfüzyon için öncelikle yüksek dozda intraperitoneal anestezi (Ketamin 60mg/kg + Xylazine 9mg/kg) yapıldı. Anestezi altındaki ratların toraks duvarı, prosesus ksifoideustan başlanıp, kostaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı. Kranial yönde kaldırılıp sabitlendi. Diyafram ve perikardiyum kesildi. 5000 ü sodyum heparin 1ml %0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra atriuma bir insizyon yapılarak, kanın dışarı akışı sağlandı. Kalp kontraksiyonu devam ederken, kanül ile apeks tarafından sol ventriküle girildi. Kanül vasıtasıyla kan vücuttan tamamen uzaklaşınca kadar, sol ventriküle %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu (yaklaşık 100-150ml) verildi. Perfüzyonun başlamasından yaklaşık 5-10dk sonra ratın tüm kanı dışarıya akıtıldı ve organlar soluklaştı. Yine sol ventrikülden yaklaşık aynı hacimde %10'luk formol çözeltisi verildi.

Formol perfüzyonuna bağı olarak ön ekstremitte ve yüz kaslarında istemsiz titremeler bütün ratlarda gözlemlendi. Fiksasyona bütün vücut sertleşinceye, özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşınca kadar devam edildi.



Resim 3.3. Karotid arterlerin mikroklipte geçici olarak kliplenmesi

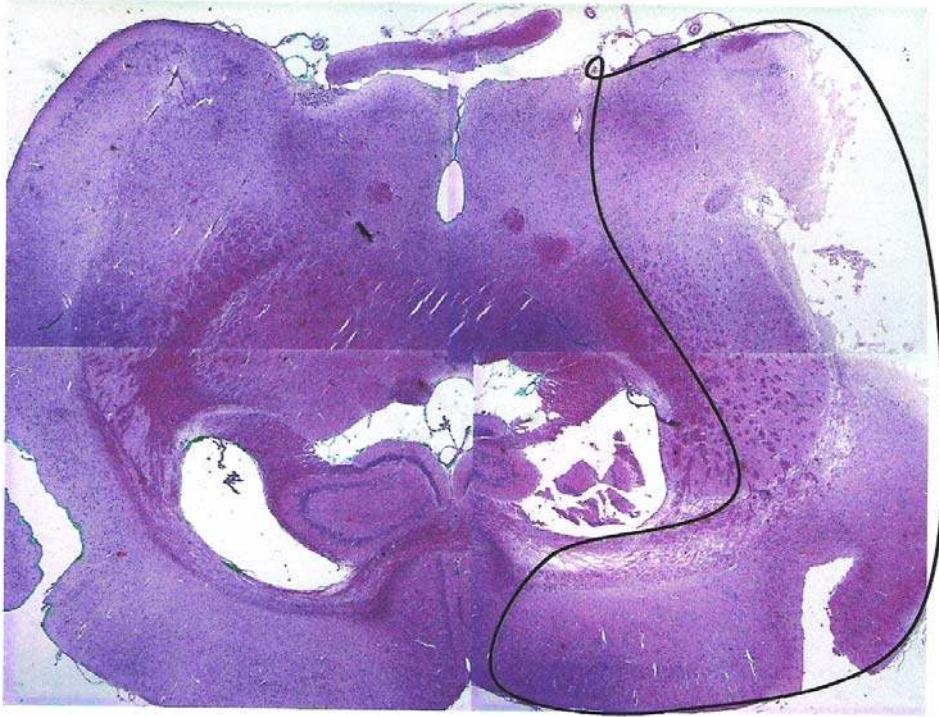
Perfüzyon tamamlandıktan sonra ratlar dekapite edildi (Resim3.4). Beyinleri bir bütün olarak çıkarıldıktan sonra %10'luk formol çözeltisinde 1-2 gün bekletildi. Standart doku takibine alınarak parafin bloklara rostro-kaudal yönde gömüldü.

3.2.3. Histopatolojik İnceleme

Serebellum uzaklaştırıldıktan sonra kaudalden rostrale doğru koronal düzlemde 2mm'lik seri dilimler alındı. Bu şekilde her bir beyin için ortalama 6 dilim elde edildi. Daha sonra fosfatla tamponlanmış %4'lük paraformaldehit ile fiks edildi. Parafin bloklardan kızaklı mikrotomla alınan 20µm'lik koronal kesitler hematoksilin-eozin (H&E) boyası ile boyandı (Resim3.5) (Resim3.6) (Resim3.7).



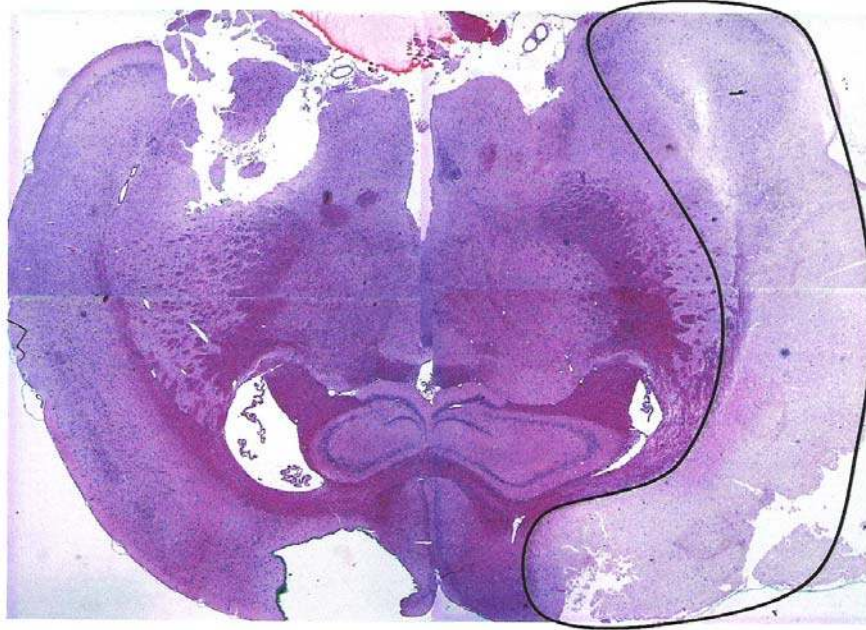
Resim 3.4. Dekapitasyon sonrası elde olunan sol OSA oklüzyonu yapılmış sol serebral enfarkt alanı



Resim 3.5. Sadece iskemi oluşturulan grupta hematoksilin-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)

Kesitlerin serebral enfarkt alan ölçümleri bilgisayara yüklenmiş görüntülerin analiz sistemi (Image J, version 1,366, NIH, Bethesda, Maryland) ile hesaplandı (53). Image J yazılımı (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) için tasarlanan "grid" eklentisi sayesinde mikroskop görüntüleri üzerine noktalı alan ölçüm cetvelleri yerleştirilerek serebral enfarkt hacimleri stereolojik bir hacim hesaplama yöntemi olan Cavalieri prensibi ile hesaplandı.

Cavalieri prensibi kısaca, eşit aralıklı ve paralel dilimlere ayrılmış bir yapının hacmini hesaplama yöntemidir. Kesitlerin aynı yöne bakan yüzeylerinde ilgilenilen yapıya ait izdüşüm yüzey alanları hesaplanarak, elde edilen "toplam yüzey alanı", ortalama kesit kalınlığı ile çarpılır ve böylece incelenen kesit görüntülerindeki yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilmiş olur. Alan hesaplaması için ise en basit ve tarafsız yöntem bir noktalı alan ölçüm cetveli kullanmaktır. Noktalı alan ölçüm cetveli, birbirlerinden eşit aralıklarla ayrılmış noktaları temsil eden sistematik + işaretlerinden oluşur. İşaretler arasında sabit bir aralık (d) bulunduğundan, her bir nokta birim kareyi (d^2) temsil eder. Bu birim kare ya da dörtgen, 'noktayla ilişkili alan' [a (p)] olarak bilinir. Bir görüntü üzerine rastgele yerleştirilen böyle bir cetvelin noktalarından kaç tanesinin ilgilenilen görüntü üzerine isabet edeceği, kesit alanının büyüklüğüne ve noktalar arası mesafeye bağlıdır. Bu artıların her birinde tesbit edilen sabit bir nokta, sayım için kullanılır (116).



Resim 3.6. Sham (Normal Salin) grubunda hematoksilin-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)

Kesit görüntüsü üzerine rastgele biçimde konuşlandırılan bu cetveldeki noktalardan ilgilenilen alanın görüntüleri üzerine düşenler sayılır. Kesit görüntüsünün alanı (A), düşen

toplam nokta sayısı (Σp) ile bir noktanın temsil ettiği alanın [$a(p)$] çarpımı ile hesaplanabilir.

$$A = \Sigma p \cdot [a(p)]$$

Cavalieri hacim hesaplama yöntemi ile yapılan hesaplamaların, gelişmiş görüntü analiz sistemleri ile yapılan hesaplamalarla kesinlik ve doğruluk açısından bir fark göstermediği ortaya konmuştur (117). Pratik ve kolay uygulanabilir olması maliyet ve zaman açısından önemlidir. Tüm dilimler üzerine düşen toplam nokta sayısı (Σp), birim test grid alanı (mm^2) [$a(p)$], dilim kalınlığı (mm) (t) olmak üzere ratların serebral enfarkt hacimleri (V) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (118).

$$V = (\Sigma p) \times [a(p)] \times t$$



Resim 3.7. Meksiletinle tedavi edilmiş grupta hematoksilin-eozinle boyanmış serebral enfarkt alanı (H&Ex20)

3.2.4. İstatiksel Verilerin Değerlendirilmesi

Fokal serebral enfarkt-reperfüzyon modeli uygulanan tüm gruplarda verilerin normal dağılım gösterip göstermediği ANOVA test, gruplar arası farklılık ise Post-Hoc Benferroni testi ile değerlendirildi. İskemiden hemen önce ve sonra ratlardan alınan arter kan gazlarının karşılaştırılmasında ANOVA ve Post-Hoc Tukey B testleri kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. İstatiksel Değerlendirme

Aşağıdaki gruplarda H&E ile yapılan boyalı kesitlerde rutin inceleme yapıldı. Toplam 3 grupta fokal serebral iskemi-reperfüzyon modelinde enfarkt hacimleri hesaplanarak standart sapmalarıyla (SD) birlikte gruplar arasında karşılaştırıldı (Tablo 4.1) (Şekil 4.1). Üç grup önce ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 4.2). Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,0001$). Gruplar arası karşılaştırma Post-Hoc Bonferroni testi ile yapıldı (Tablo 4.3).

I.Grup: On adet ratta sadece fokal serebral iskemi oluşturuldu. Post-Hoc Bonferroni testine göre normal salin verilen grupla arasında anlamlı fark saptanmazken ($p=1,000$) meksiletinle tedavi edilen grupla arasında anlamlı fark ($p<0,0001$) tespit edildi. Ortalama serebral enfarkt hacmi bu grupta $121,57 \pm 11,41\text{mm}^3$ olarak bulundu.

II.Grup: On adet rata iskemi sonrası 1ml/kg normal salin i.p olarak verildi. Post-Hoc Bonferroni testine göre sadece iskemi oluşturulan grupla aralarında anlamlı fark saptanmadı ($p=1,000$). Meksiletinle tedavi edilen grupla aralarında anlamlı fark ($p<0,0001$) tespit edildi. Ortalama serebral enfarkt hacmi bu grupta $116,08 \pm 12,36\text{mm}^3$ olarak bulundu.

III.Grup: On adet rata iskemi sonrası 60mg/kg meksiletin i.p olarak verildi. Post-Hoc Bonferroni testine göre diğer her iki grupla da (Sadece iskemi oluşturulan grup ve normal salin verilen grup) arasında anlamlı farklılık ($p<0,0001$) tespit edildi. Ortalama serebral enfarkt hacmi bu grupta $81,98 \pm 12,58\text{mm}^3$ olarak bulundu.

Tablo 4.1. Çalışma grubundaki enfarkt volüm ortalamaları ve standart sapmaları

Çalışma grupları	Ortalama enfarkt volüm (mm ³)	SD (mm ³)
Sadece iskemi uygulanan grup	121,57	11,41
İskemiye takiben normal salin verilen grup	116,08	12,36
İskemiye takiben meksiletin verilen grup	81,98	12,58

Gruplar arasında ratların ağırlıkları ve arter kan gazı sonuçları açısından (O₂ % satürasyonu, pH, pCO₂, pO₂) istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5). Değerlendirme için ANOVA ve Post-Hoc Tukey B testleri kullanılmıştır (p<0,05).

Tablo 4.2. Tüm gruplar için uygulanan ANOVA testi

HACİM

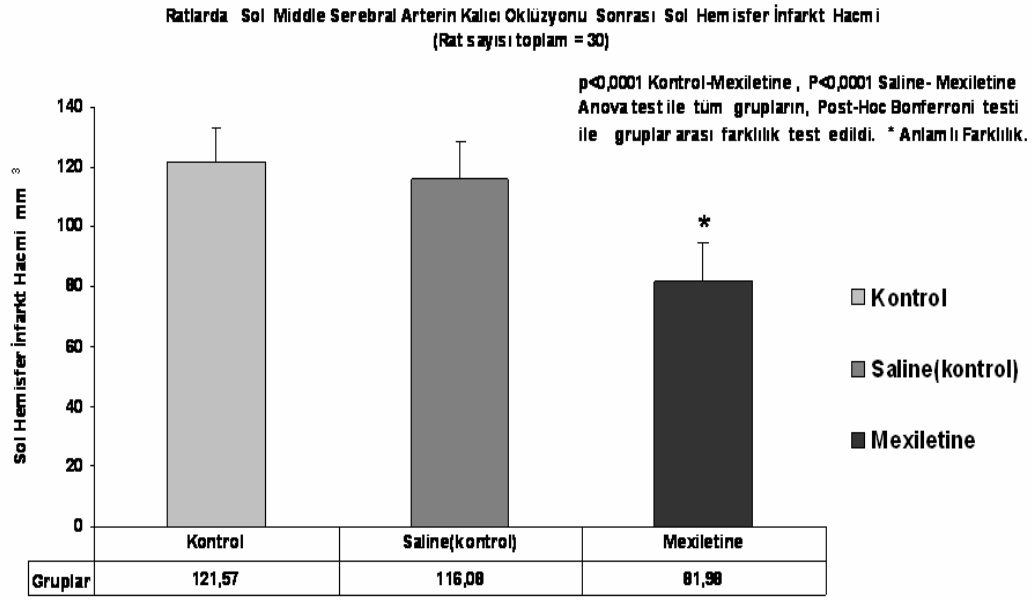
	Değişkenlerin karelerinin toplamı	df	Değişken karelerinin ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	9201,061	2	4600,530	28,136	,000
Grup içi	4414,833	27	163,512		
Toplam	13615,894	29			

Tablo 4.3. Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Bonferroni testi

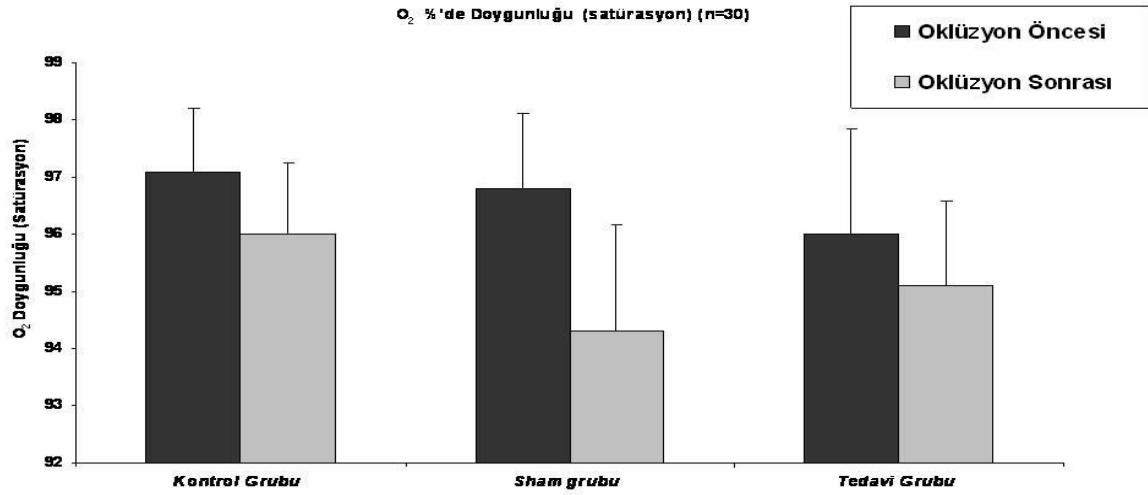
Bağımlı Değişken: HACİM

(I) Grupları (J) Grupları		Ortalama fark (I-J)	Standart Hata	Anlamlılık	%95 Güvenlik Aralığı	
					Alt sınır	Üst sınır
Kontrol grubu	Salin grubu	5,49000	5,7186	1,000	-9,1065	20,0865
	Meksiletin grubu	39,5900*	5,7186	,000	24,9935	54,1865
Salin grubu	Kontrol grubu	-5,4900	5,7186	1,000	-20,0865	9,1065
	Meksiletin grubu	34,1000*	5,7186	,000	19,5035	48,6965
Meksiletin grubu	Kontrol grubu	-39,5900*	5,7186	,000	-54,1885	-24,9935
	Salin grubu	-34,1000*	5,7186	,000	-48,6985	-19,5035

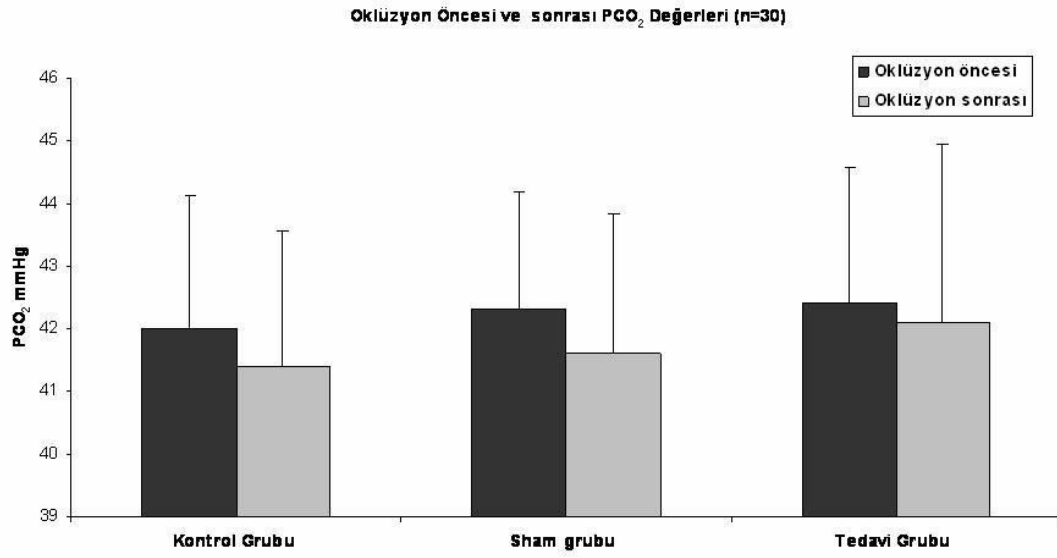
p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.



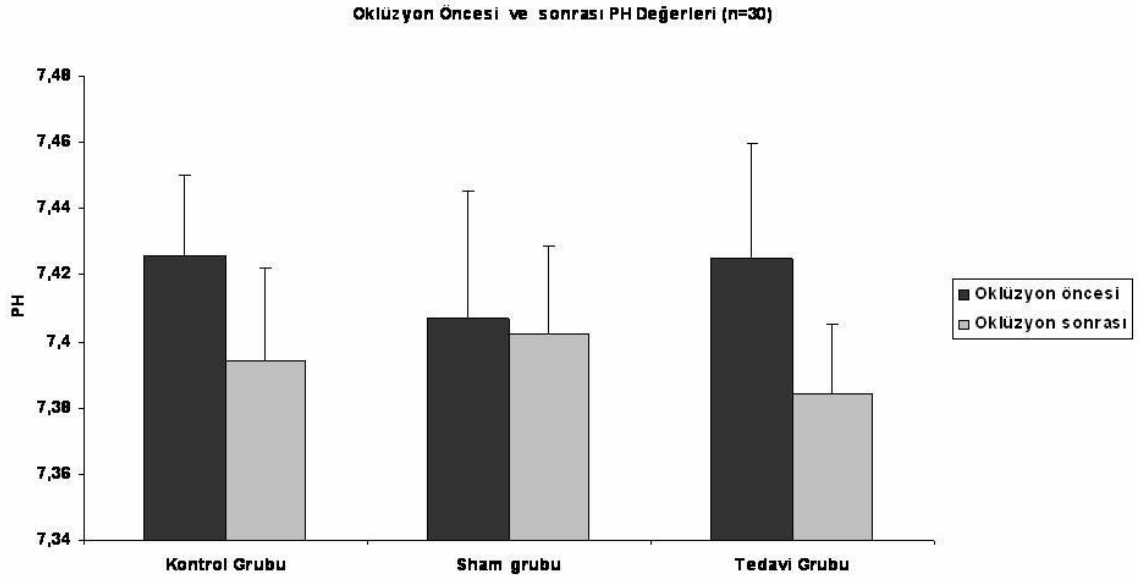
Şekil 4.1. Ratlarda sol orta serebral arter oklüzyonu sonrası her 3 grupta enfarkt hacimlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması



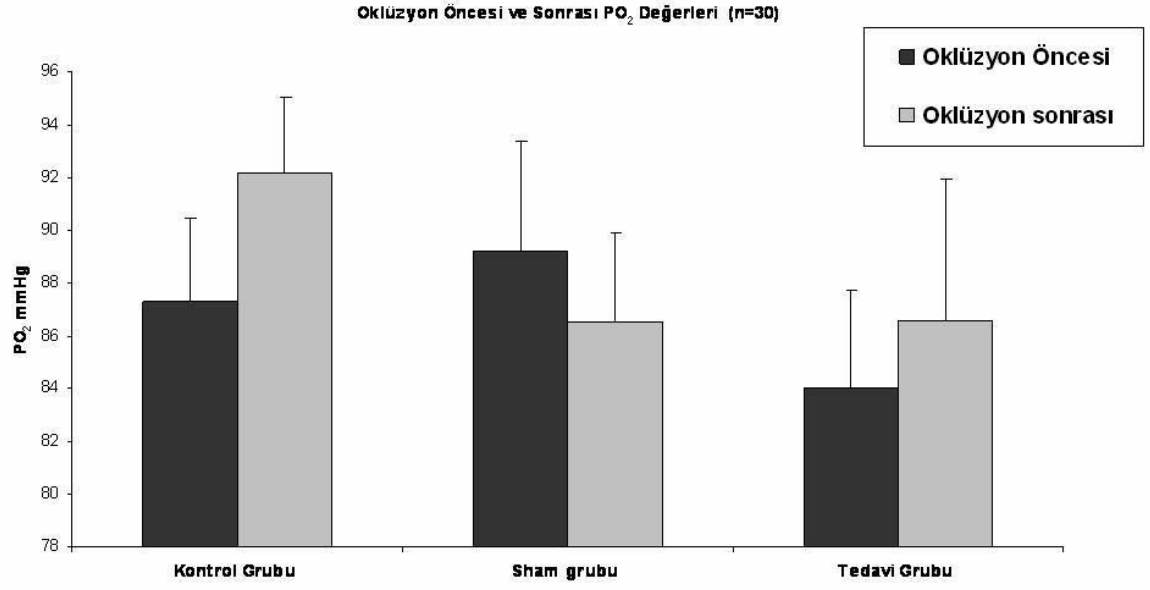
Şekil 4.2. OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter O₂ saturasyon (%)değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması



Şekil 4.3. OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pCO₂ değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması



Şekil 4.4. OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pH değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması



Şekil 4.5. OSA oklüzyonu öncesi ve sonrası gruplar arası arter pO₂ değerlerinin grafiksel olarak karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Beyin, tüm insan vücut ağırlığının %2'sine denk gelmesine karşın mevcut glukozun %25'ini, sistemik oksijenin %20'sini harcamaktadır. SSS'nin yaklaşık yarısının enerji kaynağı Na-K ATPaz iyon pompaları ile elde edilmektedir (123). Serebral iskemiyi takiben hücrelerin glukoz ve oksijen kaynaklarını kaybetmesi sonucunda iyon pompalarının ihtiyacı olan ATP mitokondriler tarafından üretilemez (124). Serebral iskemi tek bir mekanizmayla açıklanamayan çeşitli etyolojik nedene ve birçok fizyopatolojik faktöre bağlı kompleks olaylar zinciridir (125, 126, 133, 134). Beyin hasarı sonrası geçici patobiyolojik değişiklikler haftalar boyunca devam etmesine rağmen maksimum hemisferik enfarkt hacmine hasarın 72. saatinde ulaşılmaktadır (135). Günümüze kadar kullanılan birçok ajanın serebral iskemiyi değişik derecelerde azalttığı hayvanlar üzerinde çeşitli iskemi modelleriyle gösterilmiştir (119-121).

Overleri çıkarılmış Sprague-Dawley ırkından dişi ratlarda yapılan bir çalışmada, fokal serebral iskemi modeli uygulanarak ratlar yüksek ve düşük doz estradiol ile tedavi edilmiş. Gerekli istatistiksel analizleri yapılmış ve estradiolün fizyolojik konsantrasyonlarda bile serebral iskemide nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (157). Estradiolün nöroprotektif etkisini destekleyen birçok çalışma mevcuttur (151-153). Estradiolün bu etkisinden dolayı deney sonuçlarımızı etkilememesi için, deneyimizde dişi rat yerine daha önce başka çalışmalarda da kullanılmış Sprague-Dawley ırkından erişkin erkek ratlar kullandık (149).

Fokal serebral iskemi-reperfüzyon modeli iskemik beyin hasarı yaratmak için sık olarak kullanılmakta ve değişik nöroprotektif ilaçlara oldukça duyarlı cevap vermektedir (27, 127-132, 154, 156). Stroke çalışması için iyi bir model olup yapılması ve uygulanması kolaydır (136). Biz de çalışmamızı fokal serebral iskemi-reperfüzyon modelini kullanarak yaptık. Bilateral karotid arterlerin mikroklipe kapatılmasını takiben eş zamanlı olarak sol orta serebral arteri bipolar yardımıyla oklüde ettik. Önceki çalışmaları örnek alarak ratları 1 saat serebral iskemiyeye maruz bıraktık. Postoperatif 1. saatte mikroklipleri açarak iskemik alanın reperfüzyonunu sağladık (121, 136). Cerrahi işlem süresince, ratların mevcut vücut ısılarını ve arter kan gazı değerlerini normal sınırlarda tutmaya çalıştık. Bu konuda yaptığımız istatistiksel analizlerde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p < 0,05$).

Serbest radikallerin, hücre içi sodyum ve kalsiyum konsantrasyonlarının iskemik zedelenmenin patogenezindeki bu önemli rollerinden dolayı literatürde iskemik beyin zedelenmesinin önlenmesinde pek çok antioksidan, sodyum ve kalsiyum kanal blokörü denenmiştir (111, 112, 119-122). Anoksik iskemik hasarda meksiletinin koruyucu etkisi $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ değişiminin inhibisyonuna ve antioksidan özelliğine bağlıdır. Yapılan bir çalışmada $\text{Fe-Asc-H}_2\text{O}_2$ sistemi kullanılarak invitro ortamda meksiletinin lipid peroksidasyonu potent bir şekilde önlediği gösterilmiştir (139-142). Meksiletinin tavşanlarda iyon kanallarını bloke ederek lipid peroksidasyonu önlediği ve serebral vazospazmı da azalttığı tespit edilmiştir (120, 147, 148). İnvivo çalışmalarda meksiletinin KCl (Potasyum klorür)'ün indüklediği büyük damar kontraksiyonunu güçlü bir şekilde bloke ettiği gösterilmiştir. Meksiletin aynı zamanda voltaj ve reseptör bağımlı Ca^{++} kanallarına transferi de bloke eder. Yani hücre içi depolardan Ca^{++} salınımını önler (143-146). Literatürde meksiletinin deneysel subaraknoid kanama sonrası gelişen serebral vazospazmın ve travmatik spinal kord zedelenmesinin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (113, 114). Teorik olarak serebral iskeminin fizyopatolojisinde rol oynayan faktörleri düşündüğümüzde, serebral iskemik zedelenmeyi önleyecek ajanın birden fazla faktöre etki edebilmesi gereklidir. Multipotent etkinliği nedeniyle meksiletinin fokal serebral iskemik zedelenmede de etkili olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda toplam 30 rat kullanarak 3 grup oluşturduk. Postoperatif 1. saatte I. gruba hiçbir madde vermeden sadece fokal serebral iskemi-reperfüzyon modelini uyguladık. II. gruba normal salin (serum fizyolojik) i.p ve III. gruba ise meksiletin 60mg/kg i.p olarak verdik. İlaç dozunu daha önce yapılmış çalışmalardan esinlenerek belirledik (120). Postoperatif 24. saatte ratları sakrifiye ederek beyinleri bir bütün olarak çıkardık. Literatürde de yapılmış çalışmaların bir kısmında genellikle sakrifikasyon ve dekapitasyon işlemi postoperatif 24. saatte uygulanmıştır (154, 156). Çıkarılan beyinlerden ardışık dilimler alındı. Koronal kesitler elde edilerek H&E boyası ile boyandı. Serebral enfarkt hacimleri gerekli yazılımlar kullanılarak Cavalieri hacim hesaplama yöntemine göre hesaplandı. Stereolojik bir yöntem olan Cavalieri hacim hesaplama yöntemi ile yapılan hesaplamaların, gelişmiş görüntü analiz sistemleri ile yapılan hesaplamalarla kesinlik ve doğruluk açısından bir fark göstermediği ortaya konmuştur (117). İntraarteriyel nimodipinle yapılan bir çalışmada fokal serebral iskemi-reperfüzyon modeli uygulanarak

oluşturulan serebral enfarkt hacimleri stereolojik bir yöntem olan Cavalieri prensibine göre hesaplanmıştır (150).

Oluşturduğumuz toplam 3 grupta verilerin normal dağılım gösterip göstermediği ANOVA test, gruplar arası farklılık ise Post-Hoc Benferroni testi ile değerlendirildi. İskemiden hemen önce ve sonra ratlardan alınan arter kan gazlarının karşılaştırılmasında ANOVA ve Post-Hoc Tukey B testleri kullanılmıştır. Üç grup, önce ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,0001$). Ortalama serebral enfarkt hacimleri kontrol grubunda $121,57 \pm 11,41\text{mm}^3$, sham grubunda $116,08 \pm 12,36\text{mm}^3$ ve meksiletin verilen grupta $81,98 \pm 12,58\text{mm}^3$ olarak hesaplandı. Hesaplanan hacimlerin gruplar arası karşılaştırılması Post-Hoc Bonferroni testi ile yapıldı. Sadece fokal serebral iske mi oluşturulan grupla normal salin verilen grup arasında anlamlı fark saptanmazken ($p=1,000$), meksiletinle tedavi edilen grup arasında anlamlı fark tespit edildi ($p<0,0001$). Yine normal salin verilen grupla meksiletinle tedavi edilen grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,0001$).

Yaptığımız çalışmada meksiletinin önemli derecede serebral iske miye bağlı enfarkt hacmini azalttığını gördük. Meksiletin bu etkisini Na^+ kanal blokajı, Ca^{++} kanal blokajı ve/veya antioksidan etkisi üzerinden gerçekleştirmiş olabilir. Biz meksiletinin serebral iskemik zedelenmedeki koruyucu özelliğinin multifaktöriyel olduğunu düşünüyoruz. Ancak bunun için daha çok deneysel çalışma yapılarak sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Beyinde tromboemboli sonrası gelişen iskemik zedelenmenin patogeneğinde serbest radikaller, lipid peroksidasyonu, artmış hücre içi sodyum ve kalsiyum konsantrasyonları önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada sodyum ve kalsiyum kanal blokörü olmasının yanında antioksidan ve serbest radikal oluşumunu önleyici özellikleri bulunan meksiletinin iskemik beyin zedelenmesini önlemedeki rolü incelenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda meksiletinin deneysel subaraknoid kanama sonrası gelişen serebral vasospazmın ve travmatik spinal kord zedelenmesinin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışma sonunda gruplar arasında meksiletinin serebral iskemideki koruyucu özelliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Meksiletin, multipotent etkinliği nedeniyle serebral iskeminin önlenmesinde ve tedavisinde alternatif bir ilaç olarak düşünölmeli ve bu konuda daha fazla deneysel çalışma yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Yu YM, Kim JB, Lee KW, Kim SY, Han PL, Lee JK. Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke* 36 (10): 2238-2243, 2005.
2. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22 (9): 391-397, 1999.
3. Nicolas GB, Geoffrey A. Platelet activating factor and other bioactive lipids. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. 1: chapter 37, 1998.
4. Stephan GW, Bruce RR. Hypoxic-ischemic injury of white matter. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. Chapter 11, 1998.
5. Doug L, Judith KM, Dennis WC. Oxygen-glucose deprivation in neuronal cell culture. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. Chapter 9, 1998.
6. Black JA, Kocsis JD, Waxman SG. Ion channel organization of the myelinated fiber. *Trends Neurosci* 13: 48-54, 1990.
7. Hollmann M, Harley M, Heinemann S. Ca^{+2} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252: 851-853, 1991.
8. Siesjo BK. Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann N Y Acad Sci* 747: 140-161, 1994.
9. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, Mantz J, Widmann C, Desmonts J, Lazdunski M. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur J Cardiothorac Surg* 18 (2): 174-181, 2000.
10. Lips J, de Haan P, Bodewits P, Vanicky I, Dzoljic M, Jacobs MJ, Kalkman CJ. Neuroprotective effects of riluzole and ketamine during transient spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 93 (5): 1303-1311, 2000.
11. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15: 5-14, 1984.
12. Molinari GF, Laurent JP. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 7 (1): 14-17, 1976.
13. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60, 1981.

14. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18: 621-638, 1998.
15. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM Jr, Yaksh TL. Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion, electroencephalography and histology in severe and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 71-78, 1986.
16. Selman WR, Crumrine RC, Ricci AJ, LaManna JC, Ratcheson RA, Lust WD. Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 21: 467-471, 1990.
17. Macdonald RL, Stoodley M. Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38: 1-11, 1998.
18. Gökalp HZ, Erongun U. Nöroşirürji Ders Kitabı. 1'inci baskı, Ankara, Mars Matbaası, 1988.
19. Sacco RL. Vascular Disease. Ed: Rowland L. Merrit's Textbook of Neurology. 9th Edition, pp: 227-242, William and Wilkins, New York, 1995.
20. Adams RD, Victor M, Ropper AH. (Eds). Principles of Neurology. Cerebrovascular Disease 6th Edition, pp: 777-873, Mc Graw Hill Co, USA, 1997.
21. Kumral K, Kumral E. Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No:72, İzmir, 1993.
22. Kumral E, Kumral K. İnme Risk Faktörleri. Nöropsikiyatri arşivi 28: 55-58, 1985.
23. Biller J, Love BB. Vascular Disease of the Nervous System. Ed: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD, Neurology in Clinical Practice. 3rd Edition. Pp: 1125-1166, Butterwordt- Heinemann, USA, 2000.
24. Oruçkaptan H, Benli K. Serebral kan akımı, iskemi ve fizyopatolojisi, serebral korunma. Temel Nöroşirürji (Benli K). 1'inci baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, 25-48, 2004.
25. Ransom BR, Philbin DM. Anoxia induced extracellular ionic changes in CNS white matter: The role of glial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 181-189, 1992.

26. Kimberley EH, Peter KS, Howard JL. The use-dependent sodium channel blocker mexiletine is neuroprotective against global ischemic injury. *Brain Res* 898: 281-287, 2001.
27. Tortella FC, Britton P, Williams A, Lu XC, Newman AH. Neuroprotection (Focal ischemia) and neurotoxicity (Electroencephalographic) studies in rats with AHN649, a 3-amino analog of dextromethorphan and low-affinity n-methyl-d- aspartate antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 291 (1): 399-408, 1999.
28. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chanq CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22 (10): 1276-1283, 1991.
29. Suzuki Y, Matsumoto Y, Ikeda Y, Kondo K, Ohashi N, Umemura K. SM-20220 a Na^+/H^+ exchange inhibitor: effects on ischemic brain damage through edema and neutrophil accumulation in a rat middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res* 945: 242-248, 2002.
30. Turski L, Huth A, Sheardown M, McDonald F, Neuhaus R, Schneider HH, Dirnagl U, Wieqand F, Jacobsen P, Ottow E. ZK200775: A phosphonate quinoxalinedione AMPA antagonist for neuroprotection in stroke and trauma. *Proc Natl Acad Sci* 95: 10960-10965, 1998.
31. Xue QS, Yu BW, Wang ZJ, Chen HZ. Effects of ketamine, midazolam, thiopental and propofol on brain ischemia injury in rat cerebral cortical slices. *Acta Pharmacol Sin* 25 (1): 115-120, 2004.
32. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M. Neuroprotective effects of MK-801 different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 34: 2234-2239, 2003.
33. Katsumata T, Muramatsu H, Nakamura H, Nishiyama Y, Aoki Y, Katayama Y. Neuroprotective effect of NS-7, a novel Na^+ and Ca^+ channel blocker, in a focal ischemic model in the rat. *Brain Res* 969: 168-174, 2003.
34. Korenkov AI, Pahnke J, Frei K, Warzok R, Schroeder HW, Frick R, Muljana L, Piek J, Yonekawa Y, Gaab MR. Treatment with nimodipine or mannitol reduces programmed cell death and infarct size following focal cerebral ischemia. *Neurosurg Rev* 23 (3): 145-150, 2000.
35. Ted MD, Valina LD. Protection of the brain from ischemia. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. Chapter 25, 1998.

36. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Res* 307: 261-271, 1994.
37. Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 4: 59-65, 1994.
38. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426, 1982.
39. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Meth Enzymol* 58: 61-97, 1986.
40. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 222: 1-15, 1984.
41. Hall ED. Cerebral ischemia, free radicals and antioxidant protection. *Biochem Soc Trans* 21: 334-339, 1993.
42. Cassada DC, Tribble CG, Kaza AK, Fiser SM, Long SM, Linden J, Rieger JM, Kron IL, Kern JA. Adenosine analogue reduces spinal cord reperfusion injury in a time-dependent fashion. *Surgery* 130 (2): 230-235, 2001.
43. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 9 (5): 445-447, 1978.
44. Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein HZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: Myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 29: 336-348, 1991.
45. Hallenbeck JM, Furlow TW Jr. Prostaglandin I₂ and indomethacin prevent impairment of post-ischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke* 10: 629-637, 1979.
46. Abe K, Kogure K, Yamamoto H, Imazawa M, Miyamoto K. Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cerebral cortex. *J Neurochem* 48 (2): 503-509, 1987.
47. Kuehl FA, Egan RN. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 210: 978-984, 1980.

48. Hillered L, Chan PH. Effects of arachidonic acid on respiratory activities in isolated brain mitochondria. *J Neurosci Res* 14: 94-100, 1988.
49. Miller B, Sarantis M, Traynelis SF, Attwell D. Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature* 355: 722-725, 1992.
50. Francescangeli F, Goracci G. The de novo biosynthesis of platelet activating factor in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 107-112, 1989.
51. Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 55: 1-5, 1990.
52. Narumia S. Prostanoid receptors. Structure, function and distribution. *Ann N Y Acad Sci* 744: 126-138, 1993.
53. NIH (National Institutes of Health), Image Processing and Analysis in Java (Image J), version 1,366, Bethesda, Maryland, USA, 2004.
54. Dinarello CA. Biology of interleukin-1. *FASEB J* 2: 108-115, 1988.
55. John MH. Cytokines, macrophages and leukocytes in brain ischemia. *Neurology* 49 (4): 55-59, 1997.
56. Wayne MC. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 49 (4): 10-14, 1997.
57. Jhon MH, Patrick MK. Inflammatory responses in cerebral ischemia. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. Chapter 35, 1998.
58. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . *Eur J Biochem* 202: 3-14, 1991.
59. Nakagawa T, Suga S, Kawase T, Toda M. Intracarotid injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neuroprotection in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res* 1089 (1): 179-185, 2006.
60. Stern D, Nawroth P, Marcum J, Handley D, Kisiel W, Rosenberg R, Stern K. Interaction of antithrombin III with bovine aortic segments: role of heparine in binding and enhanced anticoagulant activity. *J Clin Invest* 75 (1): 272-279, 1985.

61. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP. Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (22): 8869-8873, 1990.
62. Verstraete M, Collen D. Thrombotic therapy in 80's. *Blood* 67: 1529-1541, 1986.
63. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 601-607, 1991.
64. Braughler JM, Hall ED. Correlation of methylprednisolone levels in cats in spinal cord with its effects on $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase, lipid peroxidation and alpha motor neuron function. *J Neurosurg* 56 (6): 838-844, 1982.
65. Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human endothelial cells. *Am J Pathol* 124 (2): 179-185, 1986.
66. Brox HJ, Osterud B, Bjorklid E, Fenton JW 2nd. Production and availability of thromboplastin in endothelial cells: the effect of thrombin, endotoxin and platelets. *Br J Haematol* 57: 239-246, 1984.
67. Dubois C, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M. Platelet activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages: prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J Immunol* 143: 964-970, 1989.
68. Braquet P, Touqui L, Shen TY, Varqastig BB. Perspectives in platelet activating factor research. *Pharmacol Rev* 39: 97-145, 1987.
69. Bevilacqua MP, Schleef RR, Gimbrone MA Jr, Loskutoff DJ. Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin-1. *J Clin Invest* 78: 587-591, 1986.
70. Narumiya S. Prostanoid receptors. Structure, function and distribution. *Ann N Y Acad Sci* 744: 126-138, 1994.

71. Samuelson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220: 568-575, 1983.
72. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76: 2003-2011, 1985.
73. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Clin Res* 57: 508-516, 1985.
74. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Eng J Med* 312: 159-163, 1985.
75. Vane JR, Botting RM. The role of chemical mediators released by the endothelium in the control of cardiovascular system. *Int J Tissue React* 14: 55-64, 1992.
76. McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M. Endothelin induction of adhesion molecule expression on human microvascular endothelial cells. *Neuro Sci Lett* 156: 31-34, 1993.
77. Basic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Secretion of immunoreactive endothelin-1 by capillary and microvascular endothelium of human brain. *Neurochem Res* 17: 699-702, 1992.
78. Gertler JP, Ocasio VH. Endothelin production by hypoxic human endothelium. *J Vasc Surg* 18: 178-184, 1993.
79. Ikeda K, Nagashima T, Wu S, Yamaguchi M, Tamaki N. The role of calcium ion in Anoxia/reoxygenation damage of cultured brain capillary endothelial cells. *Acta Neurochir (suppl)* 70: 4-7, 1997.
80. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tunq MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 202-211, 1994.

81. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in rat: effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25: 1469-1475, 1994.
82. Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: Myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci* 29: 336-348, 1991.
83. Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 22: 877-893, 1991.
84. Rothlein R. Overview of leukocyte adhesion. *Neurology* 49 (5 suppl 4): 3-4, 1997.
85. Gioras F, Xin kang W, Frank CB. Inflammatory mediators and brain injury the role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. *Cerebrovascular Disease: pathophysiology, diagnosis and management*. Chapter 36, 1998.
86. Takahisa N, Yasuhisa F, Masayuki I. Tacrolimus (FK-506) limits accumulation of granulocytes and platelets and protects against brain damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Biol Pharm Bull* 30 (2): 313-317, 2007.
87. Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 94 (5): 939-945, 1996.
88. Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 30 (5): 1110-1117, 1999.
89. Kaul S, Waack BJ, Padgett RC, Brooks RM, Heistad DD. Interaction of human platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Am J Physiol* 266: 1706-1714, 1994.
90. Issekutz AC, Ripley M, Jackson JR. Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *Lab Invest* 49: 716-724, 1983.

91. Melani A, Pantoni L, Corsi C, Bianchi L, Monopoli A, Bertorelli R, Pepeu G, Pedata F. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke* 30 (11): 2448-2455, 1999.
92. Kidd GA, Hong H, Majid A, Kaufman DI, Chen AF. Inhibition of brain GTP cyclohydrolase I and tetrahydrobiopterin attenuates cerebral infarction via reducing inducible NO synthase and peroxynitrite in ischemic stroke. *Stroke* 36 (12): 2705-2711, 2005.
93. Wen J, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats. *Biol Pharm Bull* 29 (4): 713-718, 2006.
94. Costa C, Zhao L, Shen Y, Su X, Hao L, Colqan SP, Stahl GL, Zhou T, Wang Y. Role of complement component C5 in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 1100 (1): 142-151, 2006.
95. Chen J, Graham SH, Zhu RL, Simon RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow and Metab* 16: 566-567, 1996.
96. Hertz L. Features of astrocytic function apparently involved in the response of central nervous tissue to ischemia-hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 143-153, 1981.
97. Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin MT. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol* 100 (6): 2073-2082, 2006.
98. Kalkan E, Eser O, Avunduk MC, Cosar M, Fidan H, Kalkan S. Apoptosis and cerebral ischemic reperfusion injury developed after haemorrhagic shock: experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 12 (4): 263-267, 2006.
99. Ekici F, Karson A, Ateş N. Adenozinin geçici orta serebral arter iskemisindeki nöroprotektif etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 5 (3): 39-42, 2004.
100. Ging KW, Corinna R, Sho-Ya W. Mexiletine block of wild-type and inactivation-deficient human skeletal muscle hNav 1.4 Na⁺ channels. *J Physiol* 554 (3): 621-633, 2003.

101. Sasaki K, Makita N, Sunami A, Sakurada H, Shirai N, Yokoi H, Kimura A, Tohse N, Hiraoka M, Kitabatake A. Unexpected mexiletine responses of a mutant cardiac Na⁺ channel implicate the selectivity filter as a structural determinant of antiarrhythmic drug access. *Mol Pharmacol* 66: 330-336, 2004.
102. Saita T, Fujito H, Mori M. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of mexiletine. *Biol Pharm Bull* 26 (6): 761-765, 2003.
103. Li H, Xu KY, Zhou L, Kalai T, Zweier JL, Hideq K, Kappusamy P. A pyrroline derivative of mexiletine offers marked protection against ischemia/reperfusion-induced myocardial contractile dysfunction. *JPET* 295: 563-571, 2000.
104. Mohammadi B, Jurkat-Rott K, Alekov A, Denqler R, Bufler J, Lehmann-Horn F. Preferred mexiletine block of human sodium channels with IVS4 mutations and its pH-dependence. *Pharmacogenet Genomics* 15 (4): 235-244, 2005.
105. Kobayashi M, Fukumoto K, Ueno K. Effect of congestive heart failure on mexiletine pharmacokinetics in a Japanese population. *Biol Pharm Bull* 29 (11): 2267-2269, 2006.
106. Inuo K, Niwano S, Morohoshi Y, Nakayama S, Ikeda K, Kojima J, Saito J, Masuda T, Izumi T. Cardioprotective effect of mexiletine in acute myocardial ischemia – Studies in the rabbit closed chest ischemia mode. *Circ J* 66: 403-410, 2002.
107. Werns SW, Lucchesi BR. Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci* 11: 161-166, 1990.
108. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996.
109. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 67-74, 1995.
110. Richter C, Kass GE. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation and differentiation. *Chem Biol Interac* 77: 1-23, 1991.
111. Saniova B. Tirilazad mesylate (Freedox)—an effective inhibitor of lipid membrane peroxidation. *Bratisl Lek Listy* 98: 339-342, 1997.

112. Tanaka K, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. A novel voltage-sensitive Na⁺ and Ca²⁺ channel blocker, NS-7, prevents suppression of cyclic AMP-dependent protein kinase and reduces infarct area in the acute phase of cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 924: 98-108, 2002.
113. Caner H, Kwan AL, Baybek M, Kilinc K, Durieux M, Lee K, Kassell NF. Systemic administration of mexiletine for attenuation of cerebral vasospasm following experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir* 142: 455-461, 2000.
114. Kaptanoğlu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 91: 200-204, 1999.
115. Wei X, Dai R, Zhai S, Thummel KH, Friedman FK, Vestal RE. Inhibition of human liver cytochrome P-450 1A2 by the class IB antiarrhythmics mexiletine, lidocaine, and tocainide. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2): 803-858, 1999.
116. Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Toplam Hacim, Hacim Yoğunluğu ve Hacim Oranlarının Hesaplanmasında Kullanılan Bir Stereolojik Yöntem: Cavalieri Prensibi. *Türk Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Özel Sayısı; Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler* 22 (1-Ek): 7-14, 2002.
117. Gundersen HJG, Boysen M, Reith A. Comparison of semiautomatic digitizer-tablet and simple point counting performance in morphometry. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 37: 317-325, 1981.
118. Yücel F, Ünal N, Erçakır M, Güven G. Rat beynindeki yaşa bağlı hacim değişikliklerinin Cavalieri Yöntemi ile saptanması. *Erciyes Tıp Dergisi* 25 (4): 179-185, 2003.
119. Graham S, Chen J, Lan J, Leach M, Simon R. Neuroprotective effects of use-dependent blocker of voltage-dependent sodium channels, BW619C89, in rat middle cerebral artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 854-859, 1994.
120. Lee E, Ayoub I, Harris F, Hassan M, Ogilvy K, Maynard K. Mexiletine and magnesium independently, but not combined, protect against permanent focal cerebral ischemia in Wistar rats. *J Neurosci Res* 58: 442-448, 1999.
121. Smith S, Meldrum B. Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26: 117-121, 1995.

122. Williams AJ, Tortella FC. Neuroprotective effects of the sodium channel blocker RS100642 and attenuation of ischemia-induced brain seizures in the rat. *Brain Research* 932: 45-55, 2002.
123. Magistretti J, Ragsdale D, Alonso A. Direct demonstration of persistent Na⁺ channel activity in dendritic processes of mammalian cortical neurones. *J Physiol* 521 (Pt 3): 629-636, 1999.
124. Urenjak J, Obrenovitch T. Neuroprotection-rationale for pharmacological modulation of Na⁺-channels. *Amino Acids* 14: 151-158, 1998.
125. Carter A. The importance of voltage-dependent sodium channels in cerebral ischaemia. *Amino Acids* 14: 159-169, 1998.
126. Martin L, Al-Abdulla N, Brambrink A, Kirsch J, Sieber F, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46: 281-309, 1998.
127. Callaway J, Knight M, Watkins D, Beart P, Jarrott B. Delayed treatment with AM-36, a novel neuroprotective agent, reduces neuronal damage after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion in conscious rats. *Stroke* 30: 2704-2712, 1999.
128. Kawasaki-Yatsugi S, Ichiki C, Yatsugi S, Shimizu-Sasamata M, Yamaguchi T. YM90K, an AMPA receptor antagonist, protects against ischemic damage caused by permanent and transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 586-591, 1998.
129. Margaill I, Parmentier S, Callebort J, Allix M, Boulu R, Plotkine M. Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischemia in normotensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 107-113, 1996.
130. Phillips J, Williams A, Adams J, Elliott P, Tortella F. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 31: 1686-1693, 2000.
131. Williams A, Dave J, Phillips J, Lin Y, McCabe R, Tortella F. Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity N-methyl-D-aspartate antagonist conantocin-G: in vitro (primary cerebellar neurons) and in vivo (rat model of transient focal brain ischemia) studies. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 378-386, 2000.

132. Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 863: 94-105, 2000
133. Arboix A, Garcia-Eroles L, Massons J, Oliveres M, Comes E. Predictive factors of early seizures after acute cerebrovascular disease. *Stroke* 28 (8): 1590-1594, 1997.
134. Perez-Pinzon M, Rosenthal M, Sick T, Lutz P, Pablo J, Mash D. Downregulation of sodium channels during anoxia: a putative survival strategy of turtle brain. *Am J Physiol* 262: 712-715, 1992.
135. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79: 1431-1568, 1999.
136. Hiramatsu K, Kassell NF, Goto Y, Soleau S, Lee KS. A reproducible model reversible, focal, neocortical ischemia in sprague-dawley rat. *Acta Neurochir* 120: 66-71, 1993.
137. Kwan AL, Solenski NJ, Kassell NF, Lee KS. Inhibition of nitric oxide generation and lipid peroxidation alternation hemolysate induced injury to cerebrovascular endothelium. *Acta Neurochir (Wien)* 139: 240-248, 1997.
138. Solenski NJ, Kwan AL, Yanamoto H, Kassell NF, Bennett JF, Lee KS. Attenuation of hydroxyl free radical generation during reversible focal ischemia with I-NG-I-arginine ethyl ester. *Stroke* 28: 2545-2552, 1997.
139. Stys PK, Lesiuk H. Correlation between electrophysiological effects of mexiletine and ischemic protection in central nervous system white matter. *Neuroscience* 71: 27-36, 1996.
140. Demirpençe E, Caner H, Bavbek M, Kılınç K. Antioxidant action of the antiarrhythmic drug mexiletine in brain membranes. *Jpn J Pharmacol* 81: 7-11, 1999.
141. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol* 186: 1-83, 1990.
142. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14, 1990.

143. De Luca A, Pierno S, Natuzzi F, Franchini C, Duranti A, Lentini G, Tortorella V, Jockush H, Camerino DC. Evaluation of the antiarrhythmic activity of mexiletine and some new analogs on sodium currents of single muscle fibers and on the abnormal excitability of the myotonic ADR mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 93-100, 1997.
144. Murakami M, Kinukawa M, Kanazama M, Maruyama K, Miyagi M, Miyata H, Ujiie A. Effects of the new class I antiarrhythmic agent Ro 22-9194, (2R)-2-amino-N- (2,6-dimethylohenyl)-N-[3- (3-pyridyl)propyl] propionamide D-tartrate, on ischemia-and reperfusion-induced arrhythmias in dogs: involvement of thromboxane A₂ synthase inhibitory activity. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 877-883, 1996.
145. Stys PK. Protective effective effects of antiarrhythmic agents against anoxic injury in CNS white matter. *J Cerebr Blood Flow Metab* 15: 425-432, 1995.
146. Tricarico D, Barbieri M, Franchini C, Tortorella V, Camerino DC. Effects of mexiletine on ATP sensitive K (+) channel of rat skeletal muscle fibres: a state dependent mechanism of action. *Br J Pharmacol* 125: 858-864, 1998.
147. Lanchote VL, Santos VJ, Cesarino EJ, Dreossi SA, Mere Junior Y, Santos SR. Enantioselective analysis of N-hydroxymexiletine glucuronide in human plasma for pharmacokinetic studies. *Chirality* 11: 85-90, 1999.
148. Waxman SG, Black JA, Ransom BR, Stys PK. Protection of the axonal cytoskeleton in anoxic optic nerve by decreased extracellular calcium. *Brain Res* 614: 137-145, 1993.
149. Chang CZ, Winardi D, Loh JK, Kung SS, Howng SL, Jeng AY, Kwan AL. Alteration of reperfusion injury in the rat neocortex by a potent antioxidant mexiletine. *Acta Neurochir (Wien)* 144: 189-193, 2002.
150. Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E, Avendano C. Reduction of infarct size by intra-arterial nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke* 26: 1888-1892, 1995.
151. Azcoitia I, Sierra A, Segura-Garcia ML. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus. Interaction with insulin-like growth factor-1 signaling. *J Neurosci Res* 58: 815-822, 1999.
152. Dubal DB, Wilson ME, Wise PM. Estradiol: a protective and trophic factor in the brain. *J Alzheimers Dis* 4: 265-274, 1999.

153. Segura-Garcia ML, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63: 29-60, 2001.
154. Harukuni I, Bhardwaj A, Traystman RJ, Crain B, London ED, Kirsch JR. Neuroprotection from focal ischemia by 4-phenyl-1- (4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is dependent on treatment duration in rats. *Anesth Analg* 87 (6):1299-1305, 1998.
155. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (11):1253-1258, 1998.
156. Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, Chmielewski PA, Linnik MD. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29 (1):152-158, 1998.