



**T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ
Nöroloji Anabilim Dalı**

**MALİGN ANTERİOR SİRKÜLASYON
İNFARKTLARINDA ERKEN
DEKOMPRESYONUN İSKEMİK İNFARKT
HACMİ, SEREBRAL ÖDEM, KAN BEYİN
BARİYERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. ÖZGE ALTINTAŞ
(Uzmanlık Tezi)**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. TALİP ASİL**

İSTANBUL 2014

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bizi en iyi şekilde eğitmeye çalışan ;ufkumuzu genişleten çok değerli hocam Prof.Dr. Talip ASİL'e,

Mesleki becerilerimize katkı sağlayan Doç.Dr.Esra GÜRSOY ,Doç.Dr.Gülşen BABACAN YILDIZ, Doç.Dr.Arif ÇELEBİ, Uzm.Dr.Mehmet KOLUKISA, Uzm.Dr.Gülşen KOCAMAN, Uzm.Dr.Halide Rengin BİLGİN, Uzm.Dr. Gülistan HALAÇ ,Uzm.Dr.Muhammed Emin ÖZCAN , Uzm.Dr.Çiğdem DENİZ'e ve rotasyonlarımda değerli bilgilerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarıma ,

Sevgili asistan arkadaşlarıma,

Asistanlık sürecinde beraber çalıştığım tüm hemşire ve hastane personeline,

Tezimin modeli oluşturulmasında destek olan yardımlarını esirgemeyen çok sevgili abim Uzm.Dr.Veysel Antar'a ve tezde emeği geçen tüm çalışma hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Gerek motivasyon gerekse deney çalışmalarında yardım eden Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar ekibine ,

Tüm hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan hep arkamda duran destekleyen ANNEME ve BABAMA ,

Hayatımın anlamı , bana ailemin en kıymetli en güzel hediyesi olan biricik KARDEŞİME

En içten teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım....

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II-III
RESİMLER LİSTESİ.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
TABLolar LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET.....	1
İNGİLİZCE ÖZET.....	2
I. GİRİŞ-AMAÇ.....	3
II. GENEL BİLGİ.....	3
2.1: RATLARDA SEREBROVASKÜLER YAPI.....	
2.1.1: Ratlarda Serebral Kollateral Yapı.....	
2.2: RAT SEREBRAL İSKEMİ TANIMI.....	
2.3: RATLARDA İSKEMİK İNME MODELLERİ.....	
2.3.1: Permanent İntraluminal proximal MCA Okluzyonu Metodu....	
2.4 : MALİGN MCA İNFARKTI ve TEDAVİ SEÇENEKLERİ.....	
2.5 : KAN BEYİN BARIYERİNİN İSKEMİDEKİ ROLÜ.....	
2.5.1: KBB Sıkı Bağlantı Proteinleri: Occludin ve Claudin-5.....	
2.5.2: Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi :	
‘Evans Blue-Sodyum Floresans Boyama’	
2.6: TTC BOYAMA	
III. MATERYAL METOD	
3.1: Hayvan Seçimi	
3.2: Hayvanların beslenmesi	
3.3: Hayvan monitorizasyonu	
3.4: Nörolojik disfonksiyon değerlendirilmesi	
3.5: Malign Serebral İskemi Metodu	
3.5.1: İntraluminal pMCAO Yöntemi Açıklaması	
3.6: Dekompresif Kraniektomi	
3.7: Çalışma Grupları	

3.8: Değerlendirilen İşlemler

3.8.1: Serebral Ödem

3.8.2: Serebral iskemik infarkt büyüklük hesaplanması

3.8.3: Kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlendirilmesi

3.8.4: Kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi

3.9: Sakrifiyon İşlemi

3.10: Etik Kurul Onayı

IV. SONUÇLAR

4.1: MORTALİTE

4.2: NÖROLOJİK SKOR

4.3: SEREBRAL ÖDEM DEĞERLENDİRİLMESİ

4.4: İNFARKT HACMİ

4.5: KAN BEYİN BARIYERİ DEĞERLENDİRİLMESİ

4.5.1: Occludin ve Claudin-5 Ekspresyonu

4.5.2: NaF –EB BOYAMA

4.6: İSTATİSTİK VERİ

V. TARTIŞMA

VI. SONUÇ

VII. REFERANSLAR

RESİMLER LİSTESİ

- RESİM 3.1:** İntraluminal pMCAO Yöntemi-1
RESİM 3.2: İntraluminal pMCAO Yöntemi-2
RESİM 3.3: İntraluminal pMCAO Yöntemi-3
RESİM 3.4: İntraluminal pMCAO Yöntemi-4
RESİM 3.5: İntraluminal pMCAO Yöntemi-5
RESİM 3.7: İntraluminal pMCAO Yöntemi-7
RESİM 3.8: İntraluminal pMCAO Yöntemi-8
RESİM 3.9: İntraluminal pMCAO Yöntemi-9
RESİM 3.10: İntraluminal pMCAO Yöntemi-10
RESİM 3.11-12: İntraluminal pMCAO Yöntemi-11,12
RESİM 3.13,14: Dekompresif Kraniektomi İşlemi -1,2
RESİM 3.15,16 : Ratlarda Sağ Juguler Ven Kataterizasyonu-1,2
RESİM 3.17,18 : Ratlarda EB/ NaF Boyaması -1,2
RESİM 3.19,20: Ratlarda Sağ Juguler Ven Kataterizasyonu-19,20
RESİM 3.21: EB/NaF Boyama Makroskopik Rat Beyin Örneği
RESİM 4.1: Hayvanların Beslenmesi ve Monitorizasyonu-1
RESİM 4.2,3: Hayvanların Beslenmesi ve Monitorizasyonu-2,3
RESİM 4.4: Rat Nörolojik Muayene Örneği
RESİM 4.5,6: Rat pMCAO sonrası Serebral Ödem Makroskopik Örnek-1,2
RESİM 4.7: Sham Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği
RESİM 4.8: Kontrol Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği
RESİM 4.9: Erken DC Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği
RESİM 4.10: Geç DC Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 2.1: Ratlarda Serebrovasküler Yapı-1

ŞEKİL 2.2: Ratlarda Serebrovasküler Yapı-2

ŞEKİL 2.3: Rat Kollateral Dolaşımı

ŞEKİL 2.4: Permanent İntraluminal proximal MCA Okluzyonu metodu şematik çizimi ve solda silikon sutur

ŞEKİL 2.5: Kan Beyin Bariyeri Sıkı Bağlantı Yapısı

TABLolar LİSTESİ

TABLO 2.1: Ratlarda Serebrovasküler Yapı

TABLO 2.2: Serebral İskemi Sırasında Viabilite Sınırları

TABLO 2.3: Rat Stroke Modelleri

TABLO 2.4: Rat İskemik İnme Modelleri

TABLO 3.1: Çalışma Grupları

TABLO 4.1: Ratlarda Nörolojik Muayene Skorlaması

TABLO 4.2: Her 4 Grup için Ayrı Skorlanmış Nörolojik Muayene Değerlendirilmesi

TABLO 4.3: Beyin Su Hacmi Değerleri

TABLO 4.4: İnfarkt Volum (mm^3) Değerleri

TABLO 4.5: Erken DC Grubunda Occludin Ekspresyonu Western Blot analizi

TABLO 4.6 : Occludin Ekspresyonu Western Blot analizi

TABLO 4.7: Erken DC Grubunda Claudin-5 Ekspresyonu Western Blot analizi

TABLO 4.8: Claudin-5 Ekspresyonu Western Blot analizi

TABLO 4.9: EB ve NaF Boyalarının Spektrofotometrik Değerleri

TABLO-5.1: Dekompresif Hemikraniektomi Çalışma Verileri Özeti

KISALTMALAR

MCA: Orta Serebral Arter –middle cerebral artery

KBB: Kan Beyin Bariyeri

CCA: Kommon Karotis Arter –Common Carotid Artery

ICA: İnternal Karotid Arter

ECA: Eksternal Karotid Arter

Pcomm: Posterior Komminikan Arter

ACA: Anterior Serebral Arter

PCA: Posterior Serebral Arter

VA: Vertebral Arter

CBF: Cerebral Blood Flow -Serebral Kan Akımı

pMCAO: proximal MCA Okluzyonu

HMW: High Molecular Weight- Büyük molekül ağırlıklı

LMW: Low Molecular Weight- Küçük molekül ağırlıklı

EB: Evans Blue

NaF: Sodyum Floresans

TTC: 2,3,5-Triphenyltetrazolium Klorür

DC: Dekompresif Kraniektomi

TCA : Triklosetik Asit

SE: Serebral Ödem

WB: Western Blot

DWI: Diffusion Weighted Imaging –Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme

NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

MMP: Matrix Metalloproteinaz

BT: Bilgisayarlı Tomografi

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

MRI: Magnetic Resonance Imaging-Manyetik Rezonans Görüntüleme

ÖZET

Malign Anterior Sirkülasyon İnfarktlarında Erken Dekompresyonun İskemik İnfarkt Hacmi, Serebral ödem, Kan beyin bariyeri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Giriş: Supratentorial infarktların %10-15'i orta serebral arter (Middle Cerebral Artery –MCA) sulama alanını tamamıyla etkilemektedir. Hastalarda optimal tedavi verilmesine rağmen mortalite-morbidite oranı %50 üzerindedir.

Yayınlanan çalışmalarda dekompresif kraniektominin (DC) hayat kurtarıcı etkisi gösterilse de ; DC'nin nöroprotektif etkisini gösteren birkaç çalışma mevcuttur. Erken DC'nin kan beyin bariyeri (KBB) üzerindeki moleküler değişiklik, infarkt hacmi ,serebral ödem ve nörolojik gidişat üzerindeki nöroprotektif etkisini sıçanlarda kalıcı intraluminal yolla orta serebral arter okluzyonu (MCAo) yöntemiyle oluşturulan deneysel modelle değerlendirdik.

Materyal-Metod: 70 erkek Spraque-Dawley sıçanı sham (n=12), kontrol (n=16) , deney 1 (n=20) , deney 2 (n=22) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. DC MCAo sonrası 4. ve 24. saatte sol temporoparietal kemik flap kaldırılarak yapıldı. Tüm sıçanlar 28. sakrifiye edildi. İnfarkt volümleri beyin kesitlerinde TTC (2,3,5,triphenyltetrazolium chloride) boyaması ; serebral ödem % beyin su içeriği hesaplaması ve KBB'deki sıkı bağlantı proteinleri claudin-5 ve occludin ise Western Blot yöntemi ile analiz edildi. KBB ekstrasvazyonu Evans Blue (EB) ve NaF (Sodyum Floresans) boyamaları ile değerlendirildi.

Sonuçlar: Beyin su içeriği ; erken DC yapılan grupta ortalama % 75.49± 1.69 , geç DC yapılan grupta %77.86±1.60 , kontrol grubunda % 74.84 ±3.04 ve sham grubunda %75.09 ± 1.33 idi. Erken ve geç DC yapılan grupların karşılaştırılmasında beyin su hacmi açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı. (p=.178)

Erken DC yapılan grupta ortalama infarkt volum $69,98 \pm 57,1 \text{ mm}^3$, geç DC yapılan grupta $577,18 \pm 468,37 \text{ mm}^3$ ve kontrol grubunda ise $451,347 \pm 216,573 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı. Erken DC yapılan grubunda istatistiksel olarak infarkt volumunda anlamlı azalma mevcuttu. ($p=.014$) Occludin ve claudin-5 ,erken DC yapılan grupta ; geç DC yapılan grupla karşılaştırıldığında yüksek seviyede eksprese edildiğı gösterildi. (occludin için $p=.013$; claudin-5 için $p=.034$) . EB ve NaF boyamalarının KBB geirgenliğı üzerinde etkisini gösteren anlamlı istatistik verileri elde edilmedi.(sırasıyla $p=.274$; $p=.284$)

Sonuç: Bu alışma erken DC'nin malign MCA infarktlarında nöroprotektif etkisini göstermektedir.

ABSTRACT

Neuroprotective Effects of Hemicraniectomy in Malign Middle Cerebral Artery Infarctions: Experimental Study

Introduction: Despite optimal medical therapy the mortality rate approaches 50% in MCA infarctions. Although recent studies have been showed life-saving effect of hemicraniectomy; there are a few data available in regard to neuroprotection effect of decompressive craniectomy (DC). We induced a malign cerebral ischemia model by intraluminal permanent MCA occlusion (MCAo) in male rats for defining the neuroprotective effects of early DC on brain-blood barrier (BBB) molecular changes, infarct size, cerebral edema.

Material-Method: 70 male Sprague Dawley rats were allocated to 4 group; sham (n = 12), control (n = 16), experiment 1 (n = 20), experiment 2 (n = 22). DC was performed by creating a bone flap, after MCAo at 4th and 24th hours. After 28 hours of survival, all animals were sacrificed. Infarction volumes were calculated from TTC(2,3,5,triphenyltetrazolium chloride)-stained brain sections. In all groups, cerebral edema were quantified as a change in % brain water content. Western Blot was used to analyze the expression of tight junction protein claudin-5 and occludin. EB (Evans Blue) and NaF (Sodium Fluorescence) staining was used to analyze the extravasation of BBB.

Results: Brain water content was calculated $75.19 \pm 1.69\%$ in the early DC group and $77.76 \pm 1.60\%$ in the late DC group. No significant difference was found between experiment groups. ($p = .178$) In the early DC group; occludin and claudin-5 were significantly expressed at higher levels compared to late DC group (for occludin $p = .013$; for claudin-5 $p = .034$). At early DC group ($69.38 \pm 57.11 \text{ mm}^3$) the final infarct volumes were significantly smaller than in the late DC group ($577.18 \pm 468.37 \text{ mm}^3$) ($p = .014$). For BBB staining (EB and NaF) ,there were no significant relationship.(respectively $p = .274$; $p = .284$)

Conclusion: The study results supported the neuroprotective effects of early DC in malign MCA infarcts.

I. GİRİŞ-AMAÇ:

Supratentorial infarktların %10-15'i orta serebral arter (MCA) sulama alanını tamamiyle etkilemektedir. Hastalarda optimal tedavi verilmesine rağmen mortalite-morbidite oranı %80 üzerindedir. (1,13,14,15,16,65)

Biz bu deneysel çalışmada erken ve geç dönem dekompresif kraniektomi cerrahisinin serebral ödem ve kan beyin bariyeri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda erken dekompresyonun ratlarda disabilitayı ,serebral ödem ve infarkt hacmini azalttığı gösterilmiş olsa da ,kan beyin bariyeri üzerindeki moleküler düzeyde etkisi üzerine henüz çalışma yapılmamıştır.(17,32) Planladığımız çalışmada erken dönemde yapılan (4.saat) dekompresif kraniektomi sonucu sıçanlarda disabilitenin daha düşük oranda görülmesi; serebral ödeme (vazojenik ödem) neden olan kan beyin bariyeri (KBB) disfonksiyonuna ilişkin parametrelerin (occludin-5 ,claudin) değerlendirilmesi amaçlandı.

II. GENEL BİLGİ:

İnme ,populasyonlarda sosyoekonomik önemi giderek artan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (65) en önemli mortalite sebeplerinden 2. ; morbidite sebeplerinden 3. sırada gelmektedir. İnme etyolojisine göre iki ana grupta incelenmekte olup %80 iskemik inme görülmektedir. İnme tedavisinde birincil ve ikincil koruma yöntemleri ,risk faktörleri değerlendirilmesi ; akut terapötik pencerede rekanalizasyon/ reperfüzyon çalışmaları ve deneysel olarak devam eden nöroprotektif tedavi seçenekleri mevcuttur.(1,65)

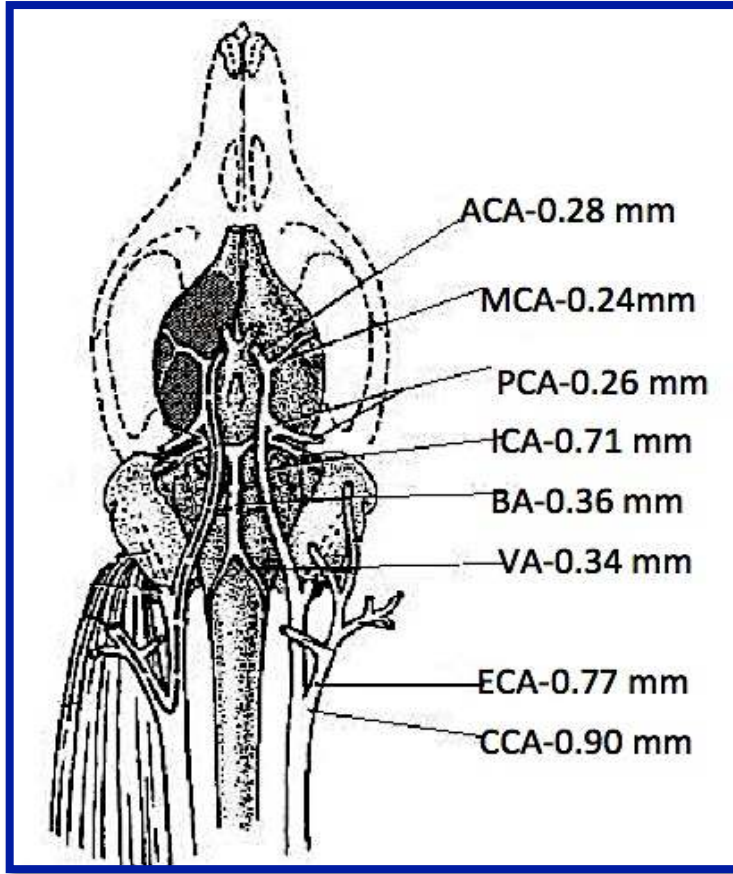
Deneysel çalışmalar inme tedavisinde terapötik pencere genişletilmesi ve özellikle nöroprotektif tedavi seçenekleri geliştirilmesi amacıyla son yıllarda önem kazanmıştır. İnme etyolojisinin multiple risk faktörlerine dayanması ,her vakada prezentasyonunun ve anatomik lokalizasyonun farklı olması ; insanlarda histopatolojik ,biyokimyasal /fiziyojik değerlendirmeler için invaziv işlem gerekli olması ve iskemik olay başlangıcının sn-dk-saat şeklinde takip edilmesinin mümkün olmaması nedeni ile hayvan modelleri deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır.(2)

1970'lerden beri iskemik inme hayvan modellerinde primatlar, domuzlar, kedi/ kopek, tavşan , rat ve fare türleri kullanılmaktadır. 1990'larda ise transgenik fare türü iskemik inme deneysel modellerinde daha sıklıkla vasküler risk faktörleri araştırılması amacıyla kullanılmaktadır.(3) Hayvan deneysel çalışmalarında ise rat modelleri iskemik modelleme için prosedürde rat ağırlığının düşük olması , diğer hayvan soylarına görece daha homojenize (in-bred üretim) olması , ratların serebrovasküler anatomi ve fizyolojisinin daha üst basamaklara yakın olması , ratların beyin hacmi küçük olduğu için biyokimyasal analizde fiksasyon prosedürlerine daha uygun olması , prosedürde monitorizasyonun kolay ve ratlara etik onay açısından ulaşılabilirliğin diğer türlere göre daha kolay olması nedeni ile sıklıkla kullanılmaktadır. (2,3)

Serebral iskemi modelinde amaç ;beyine giden Glukoz/Oksijen gereksinimini durdurmak ve sonuçta iyonik mekanizmalar bozulması ile moleküler hücresel değişikliklerle hasara yol açmaktır.(2)

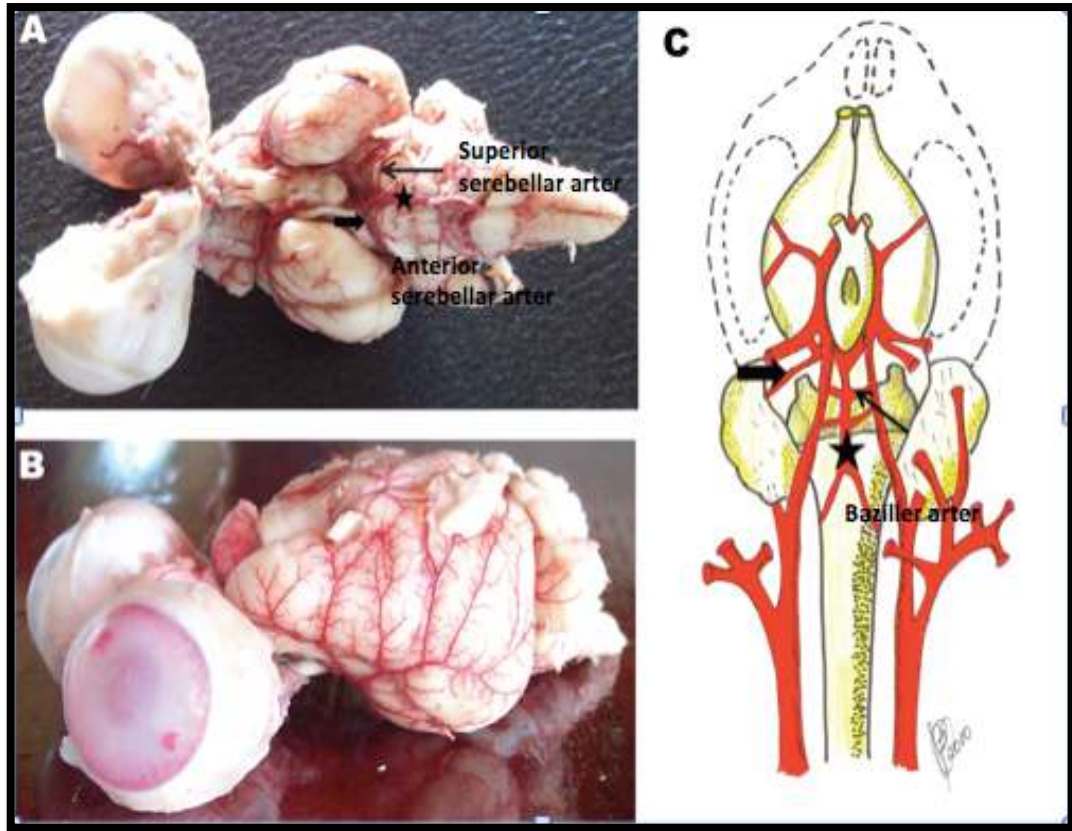
2.1: RATLARDA SEREBROVASKÜLER YAPI:

Ratlarda beyin anterior ve posterior dolaşım ; anterior serebral ve posterior kommunikan arterle oluşan Willis poligonu ile bağlanan dört ana arter tarafından olmaktadır. Arcus aortadan innominat arter, sol kommon karotis arter (CCA) , sol subklavian arter ayrılır. Innominat arter sağ subklavian ve sağ CCA olmak üzere ikiye dallanır. Boyun bölgesinde CCA lateralde internal karotid arter (ICA) ve medialde eksternal karotid arter (ECA) olarak ikiye ayrılır. ICA (anterior sirkulasyon) intrakranial bölgede orta serebral arter (MCA) major dalı olmak üzere posterior kommunikan arter (Pcomm) ve anterior serebral artere (ACA) ayrılır. Posterior serebral arter(PCA) ise Pcomm dalı olarak çıkar. Vertebral arterler (VA) (posterior sirkulasyon) subklavian arterden origin olarak foramen magnumdan kafa tabanına girer Willis poligonunu oluşturmak üzere baziller arteri meydana getirir. (5) (Bkz. Şekil 2.1 ve 2.2 ; Bkz. Tablo 2.1)



ŞEKİL 2.1: Ratlarda Serebrovasküler Yapı-1

(6) Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson and R. Cummins. *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989 ;Vol 20(1): 84-91.*



ŞEKİL 2.2: Ratlarda Serebrovasküler Yapı-2

(7) *Juliana B Casals ve ark. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review. 2011; Vol 61, No 4 :305–313*

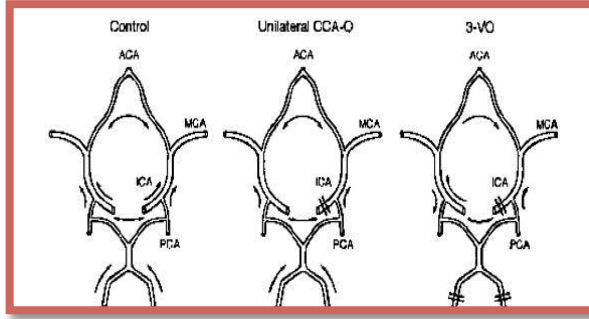
RAT	Dalları	Beslediği Alan
ICA	Hipotalamik Arter	Olfaktor traktus lateral yüz ve Serebral Korteks
	Anterior Koroidal Arter	
	ACA	
	MCA	
	Pcomm	
Baziller Arter	VA	Willus poligonu posterior
	PCA	
PCA	Pcomm	

TABLO 2.1:Ratlarda Serebrovasküler Yapı

(7) Juliana B Casals ve ark. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review. 2011; Vol 61, No 4 :305–313

2.1.1: Ratlarda Serebral Kollateral Yapı:

Ratlarda ,ICAdan MCA laterale doğru ACA mediale doğru origin alarak beyni sular. ACA-MCA arasındaki distal dallar dorsal hemisferde orta çizgiden yaklaşık 2-3 mm lateralde anastomoz yapar. (8) Normal insanlara göre bu kollateral anastomozların sayısı ratlarda 4-5 kat daha fazladır. (9) (Bkz. Şekil 2.3)



ŞEKİL 2.3: Rat Kollateral Dolaşımı

Açıklama: Kontrollu durumlarda farklı kollateral dolaşım paternlerinin gösterildiği ratlarda willis poligonu anterior dolaşım şematik çizimi.(Kontrol grubu , tek trafı CCA okluzyonu ve tek trafı CCA okluzyonu ile bilateral VA okluzyonu ile)

(10) Hans-Jörg Busch ve ark.Arteriogenesis in Hypoperfused Rat Brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.2003.23:621–628

2.2: RAT SEREBRAL İSKEMİ TANIMI :

Ratlarda serebral iske mi; serebral kan akımı (CBF) < 25ml/100mg/dk altına düştüğünde 8 dk içinde nöronal hasar , 30 dk sonra infarkt dokusu gelişir ve 3 saat sonra iske mi-reperfüzyon alanı değişmez. (11,12) (Bkz.Tablo 2.2)

TABLO 2.2: Serebral İskemi Sırasında Viabilite Sınırları:

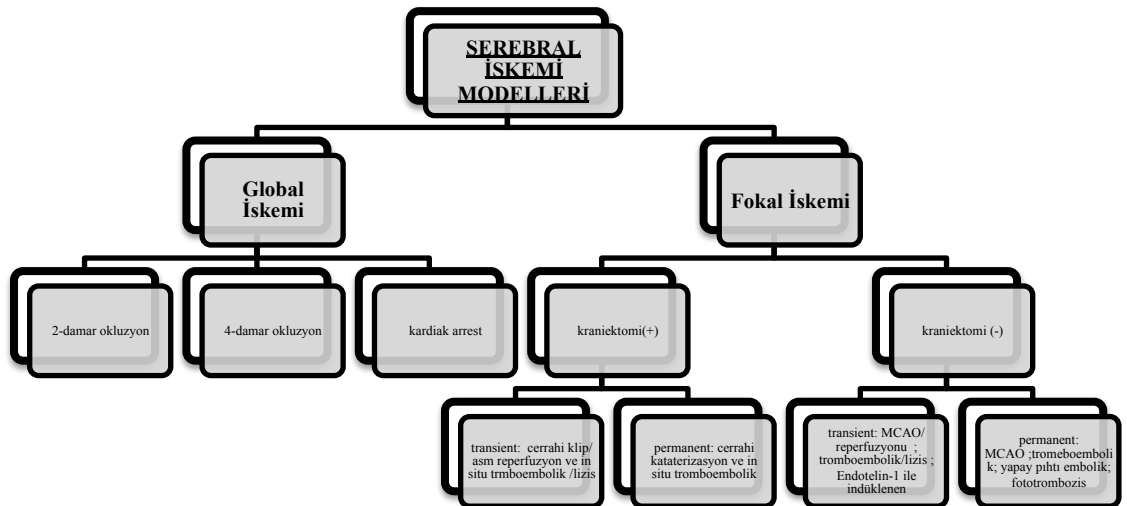
Perfüzyon sınır değerleri	ml/g/dk
Protein sentezi durması	0.55
Anaerobik glikozis	0.35
Transmitterlerin sinaptik salınımı (glutamate v.b.)	0.20
Enerji metabolizma yetmezliği	0.20
Anoksik depolarizasyon	0.15

2.3: RATLARDA İSKEMİK İNME MODELLERİ :

A-Risk Faktörleri için : Çevresel /genetik etkenlerle vasküler yapı değişikliği oluşturulan modeller (4)

B-Patofizyoloji / Terapötik Yaklaşım için: Rekanalizasyon, Nöroprotektif , Nöroreparatif çalışma modelleri kullanılmaktadır. (3)

Rat İskemik İnme Modelleri:



TABLO 2.3: Rat Stroke Modelleri

Serebral İskemi Hayvan Modelleri:

<i>Hayvan modeli</i>	<i>Olası İnsan Karşılığı</i>	<i>Histolojik Bulgular</i>
Global İskemi:		
A.Permanent	Kardiak arrest	Serebral ödem,hücre ölümü
B.Transient	Başarılı resüsitasyonla kardiak arrest	Geçikmiş nöronal ölüm,astrogliozis
Fokal İskemi:		
A.Permanet	Hemisferal iskemik inme	Pannekroz,inflamasyon
B.Transient	Spontan rekanalizasyon ya da trombolitik tedavi olan iskemik inme	Pannekroz,inflamasyon
C.Uzamış Transient	Transient iskemik inme	Geçikmiş nöronal ölüm,astrogliozis

TABLO 2.4: Rat İskemik İnme Modelleri**(12) Wolfgang Walz.Rodent Models of Stroke.Springer 2010**

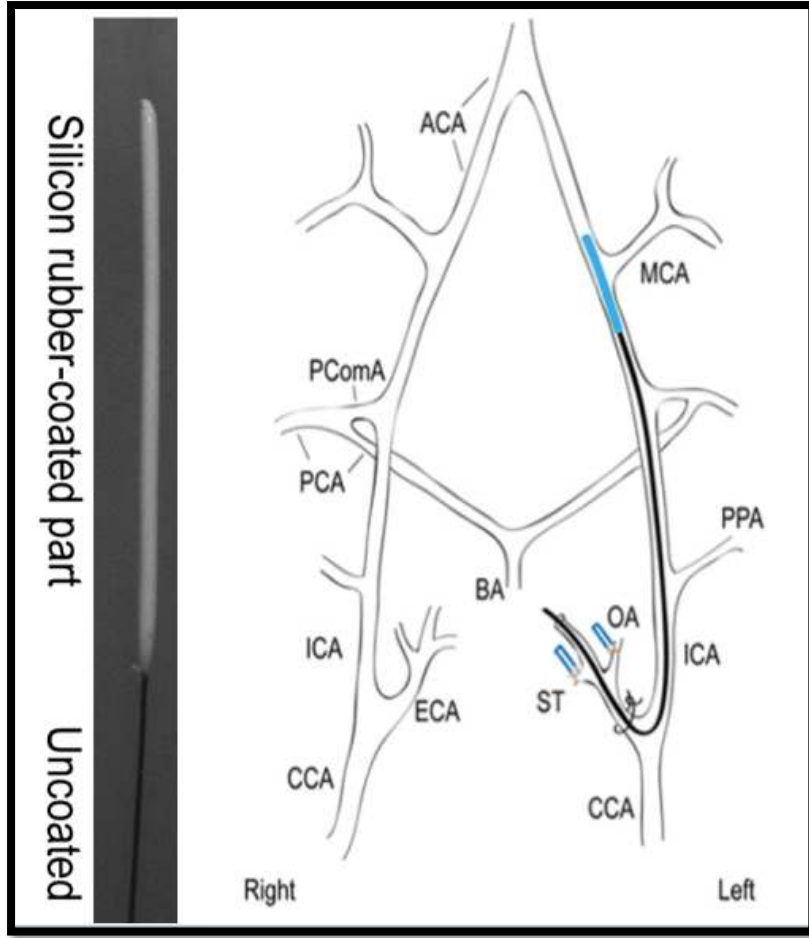
Global iskemi modeli kardiopulmoner resusitasyon sonrası beyin hasarı araştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Ratlarda kontrollü hipotansiyon eşliğinde (ortalama arterial basınç 100-110 mmHg) ekstrakranial damarların permanent veya transient okluzyonu ile gerçekleştirilen bu modellerde global serebral iskemi yaratılarak hipokampal iskemi geliştiği için çalışma belleği ,davranışsal çalışmalar , nörotransmitter metabolizma çalışmaları ve postresusitasyon hipotermi çalışmaları yapılabilir. Fakat ekstrakranial damarların bağlanması sonrası kollateral dolaşım sorunu,beyin sapı etkilenmesi ve postiskemik nöbet modelin dezavantajları olmaktadır. Anestezi altında iken ratlarda nörolojik muayene yapılamaması ve postiskemik süreçte survinin kısa olması deneysel çalışmaları bu modelde sınırlamaktadır. (Bkz. Tablo 2.3,2.4)

Fokal iskemi modelinde ise istenilen damar alanında permanent veya transient infarkt alanı çeşitli modellerle yapılabilmektedir. Özellikle bu modelleri iskemik inme rekanalizasyon / nöroprotektif tedavi çalışmalarında tercih edilmektedir. (Bkz. Tablo 2.3,2.4)

2.3.1: Permanent İntraluminal proximal MCA Okluzyonu Metodu:

Tez çalışmasında rat iskemik inme modellerinden özellikle terapötik yaklaşım amacıyla malign serebral iskemi oluşturulması amacıyla , fokal rat iskemi modellerinden permanent intraluminal yol ile proximal MCA Okluzyonu (pMCAO) modelini tercih ettik.

İntraluminal yol ile pMCAO rat iskemi modeli en sık kullanılan model olup ek cerrahi işlem gerektirmeden intraluminal okluzyon ile uygulanabilirliği yüksek insan iskemik inme modeline en yakın olan deneysel hayvan modelidir. (58) CBF 'de %80 azalma gerçekleşerek yapılan çalışmalarda sıklıkla korteks ve kaudoputamen infarktı gözlenmiştir. (11) Bu modelde silikon kaplı naylon sutur ile ICA yolu ile MCA origini oklude edilir. Transient iskemi için 30-120 dk arasında suture yerinde tutulup geri çekilir. Bu şekilde selektif nöronal ölüm gerçekleştirilir. Permanent iskemide özellikle striatum ve korteks infarktı meydana gelmektedir. (Bkz.Şekil 2.4) İntraluminal sutur uzunluğu ACA'ya kadar 17-20 mm ,MCA'ya kadar 11-13 mm arasında değişmektedir. (Bkz.Şekil 2.4) Suture boyutu hayvan ağırlığı ve yaşı göz önüne alınarak ayarlanmalıdır. Bu modelde sutur boyutuna mekanik travma sonucu arterial disseksiyon gelişimi ile subaraknoid hemoraji riski nedeni ile dikkat edilmelidir. Aynı şekilde mekanik travma ile endotelyal hasar olabileceği ve bu nedenle reperfüzyon çalışmasının riskli olacağı unutulmamalıdır. Modelde özellikle 2 saatten uzun yapılan (3 saatten kısa) transient iskemi çalışmalarında spontan hipertermi gelişiminin infarkt hacmini etkileyebileceği akılda tutulmalıdır. (11)



ŞEKİL 2.4: Permanent intraluminal proximal MCA okluzyonu metodu şematik çizimi ve solda silikon sutur

2.4: MALİGN MCA İNFARKTI ve TEDAVİ SEÇENEKLERİ:

Supratentorial infarktların %10-15'i orta serebral arter (MCA) sulama alanını tamamiyla etkilemektedir. Fatal serebral iskemi gelişimi akut iskemik infarktlı hastaların %1-5 'inde meydana gelmektedir. (13) Hastalarda optimal tedavi verilmesine rağmen mortalite-morbidite oranı %80 üzerindedir. (13,14,15,16)

Karotis arter sulama alanında meydana gelen akut iskemi masif serebral ödeme yol açması sonucu intrakranial basınç yükselmesi ve komaya progresyon hatta unkal,singulat veya tonsiller herniasyon sonucu ölüm meydana gelmektedir. Bu süreç klinik gözlemsel çalışmalar ve otopsi serileri ile iyi dokumente edilmiştir. (17)

Günümüze kadar barbiturat / propofol ile sedasyon ,hiperventilasyon ,osmotik terapi seçenekleri şeklinde birçok konservatif tedavi stratejileri serebral shifti önlemek ve intrakranial basınç artışını azaltmak için uygulanmıştır. (13) Fakat , randomize çalışmaların hiçbirinde bu konservatif tedavi seçeneklerinin klinik outcome üzerine olan etkisi değerlendirilmemiştir. (18) Sınırlı medikal tedavi seçeneklerinin olması nedeni ile ; geniş hemisferik infarkt ve ödem sonucu nörolojik defisiti gelişen hastalarda dekompresif cerrahi iyi bir seçenek olmaktadır. Dekompresif kraniektomi sadece mortaliteyi azaltmakla etki etmemekte aynı zamanda uzun süreçte morbiditeyi anlamlı şekilde azaltmakta ve muhtemelen kan beyin bariyeri (KBB) üzerindeki hasarı azaltarak hem de leptomeningeal kolleteral üzerinden serebral perfüzyon basıncını arttırarak iskemik infarkt alanını azaltmaktadır. (17) Bu tedavi seçeneği masif serebral iskemik inme hastalarında çalışmalarda etkinliği değerlendirilmiş olsa da optimal tedavi penceresi hakkında halen tartışmalar devam etmektedir. (15,16,17)

2.5: KAN BEYİN BARIYERİNİN İSKEMİDEKİ ROLÜ:

İskemik inme sonrası dakikalar içerisinde serebral patofizyolojik değişiklikler hem hücresel hem de moleküler düzeyde meydana gelmektedir. İskemik inme patofizyolojisinde rol oynayan önemli yapıda KBB'dir. (19,20,21) KBB beyin parankimine kapillerden molekül geçişini sınırlandırarak nöronal mikroçevreyi korumaktadır. (22) KBB bütünlüğü bozulması sonucu serebral hemoraji,vazojenik ödem ve nöronal hücre ölümü meydana gelmektedir. (23)

Kan beyin bariyeri;

- 1-Kandan beyine polar maddelerin pasif difüzyonunu kısıtlıyarak ,
 - 2-Beyin parankimine besinlerin transport yanında toksik metabolitlerin atılımını sağlayarak,
 - 3-İmmun hücrelerin migrasyonunu regüle ederek ,
- santral sinir sisteminde homeostazı korumaktadır.

2.5.1: KBB Sıkı Bağlantı Proteinleri: Occludin ve Claudin-5:

Nörovasküler unite perisit, perivasküler microglial hücreler, astrosit ve nöronlardan oluşmaktadır ve yüksek fonksiyonel hücre-hücre bağlantıları ile kan beyin bariyeri işlevleri yürütülmektedir.

Kan beyin bariyerindeki endotel hücreler sıkı bağlantıların olması ve spesifik transport sistemlerinin olması ile özel yapıya sahiptir.

Sıkı bağlantılar endotelde özellikle apikal interselüler bağlantı kompleksinde yer almakla birlikte üç ana görevi bulunmaktadır:

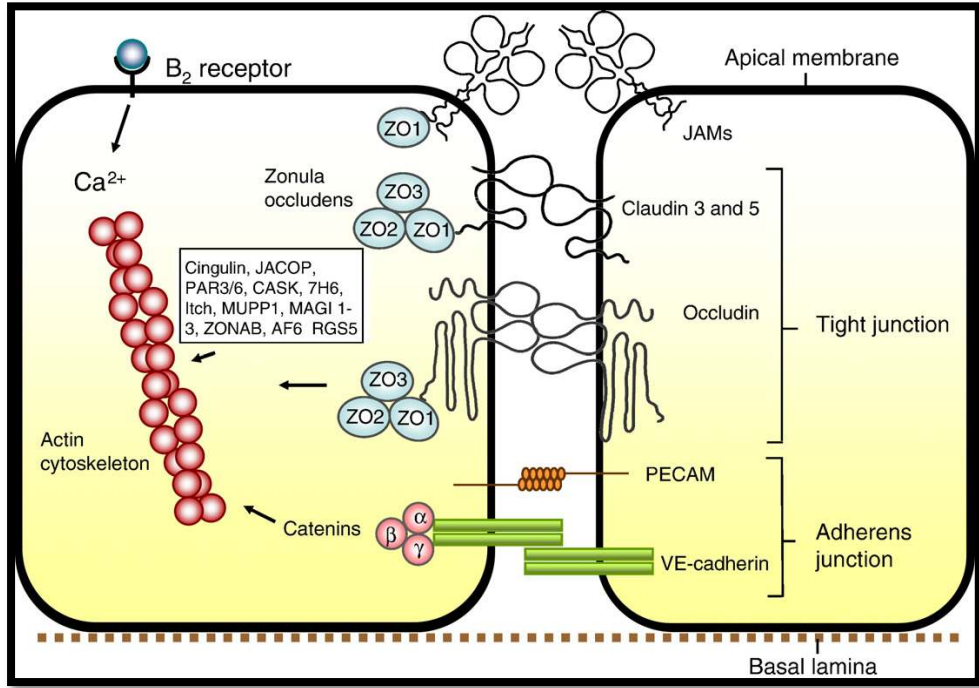
- 1-Kandan polar madde parasellüler geçişi için bariyer olmak,
- 2-Lipid ve integral membran proteinlerinin difuzyonunu önleyici olmakta ve böylece hücre polarizasyonu sürdürülmesinde katkı sağlamak,
- 3-Hücre içi sinyal yollarında görev almak.

Beyin endotelyal sıkı bağlantı proteinleri integral membrane proteinleri olan occluding ,claudin ve kavşak adezyon moleküllerinden oluşmakta ve sitoplazmik iskelet yapıları ile (zonula okludens proteinleri) bağlanarak hücreler arası iletişimde rol oynamaktadır.(24,25,26,27)

Occludin 60 kDa moleküler ağırlığında olup ilk tariflenen integral proteindir. Occludin dört transmembran ,iki ekstraselüler ,3 sitoplazmik alt birimden oluşmaktadır. Occludin hücre içerisinde sitoskeletal yapılardan zonula okludens ile bağlanarak hücre membran stabilizasyonuna katkı sağlamaktadır. Occludin sıkı bağlantı yapılarının regülasyonunda önemlidir. (24,25,26,27)

Claudin 20-27 kDa moleküler ağırlığında olan 24 farklı sıkı bağlantı protein ailesindendir. Occludin gibi claudin de dört transmembran ,2 ekstraselüler alt birim ve farklı olarak kısa karboksil kuyruk içeren integral proteindir. Beyinde tüm bölümlerde sentezlenmekle birlikte claudin ailesinden 1,2,3,5,11,12 ekspresyonunun sık olduğu gösterilmiştir. (24) Claudin-5 santral sinir sisteminde erken angiogenez evresinde anlamlı rol oynamaktadır. (25)

Kan ve beyin parankimi arasında endotelial hücre ve ilişkili astrositik hücre ayaksı çıkıntıları ‘sıkı bağlantıları’ oluşturmaktadır. (28) Sıkı bağlantı proteinleri occludin ve claudin-5 endotelial bariyer oluşturmaktadır ve bu bariyer paraselüler geçirgenliğin major belirleyicisini oluşturmaktadır. (29) Serebral iskemi-reperfüzyon hasarı derecesi ve patogenezinde sıkı bağlantı hasarı direkt rol oynamaktadır.



ŞEKİL 2.5: Kan Beyin Bariyeri Sıkı Bağlantı Yapısı

(27) N. Joan Abbott , Adjanie A.K. Patabendige, Diana E.M. ve ark.

Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of Disease
37. 2010 ; 13–25

Açıklama:

Sıkı bağlantı kompleksi Claudin-3 ve Claudin-5 ile Occludin proteinlerinden oluşmaktadır. Cadherin proteinleri (adherens proteinleri) yapısal bütünlüğü sağlamakta ve sıkı bağlantı protein formasyonu için gerekmektedir. Claudin-3 ve Claudin-5 proteinleri sayesinde kan beyin bariyerinde yüksek elektriksel direnç ve difüzyon için bariyer oluşmaktadır. Occludin ise küçük iyonların geçişine dirençli olmak dışında sıkı bağlantı protein olarak görev yapmaktadır. Occludin ve Claudin hücre içi sitoskeletal yapı ile bağlanarak actin/myosin sitoskeletal sistem aktivasyonunda rol oynamaktadır. Kavşak

adezyon proteinlerinin görevi tam bilinmemekle ,lökositler için adezyon görevi olabileceği düşünülmektedir. (Bkz. Şekil 2.5) (27)

2.5.2: Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi :

‘Evans Blue-Sodyum Floresans Boyama’

Deneysel çalışmalarda büyük ve küçük molekül ağırlıklı (HMW-High Molecular Weight /LMW-Low Molecular Weight) maddelerin kimyasal geçişini değerlendirmek amacıyla sırasıyla periferel verilen Evans Blue (EB, 961 Da) ve Sodyum Floresans (NaF, 376 Da) boyaması sıklıkla kullanılmaktadır. (62,64)

Evans Blue (EB) ,serum albumine (69.000 Da) sıkıca bağlanarak büyük molekül ağırlıklı madde olarak dolaşımda bulunmakta ve HMW maddelerin KBB geçişini temsil etmekte ,KBB’ni endotel hücreler arasındaki pinositik veziküllerden geçmektedir. Buna karşın Sodyum Floresans (NaF) albumine bağlanmamakta serbest olarak dolaşımda bulunmakta bundan dolayı LMW maddelerin KBB geçişini temsil etmekte ve interendotelyal yarıklardan paraselüler olarak KBB’ni aşmaktadır. (62) Bu özellikleri ile iki boyama yöntemi de KBB’den hem HMW hem de LMW madde geçişini göstermesi yönünden önemlidir.

Biz bu iki farklı molukler ağırlıkta boyama yöntemini kullanarak ,iskemi ve dekompresif kraniektomi sonrası KBB geçirgenliğinin değişimini değerlendirmeyi hedefledik.

2.6: TTC BOYAMA:

1958’den beri 2,3,5-triphenyltetrazolium klorür (TTC) insanlarda miyokartta iskemik dokuyu ayırt etmekte kullanılmaktadır. (30). TTC suda çözünebilir ,renksiz, iç mitokondrial membran oksidatif enzimleri ile reaktif olan aktif oldukça ortaya çıkan yağlı çözünür içeriği ile normal dokuyu koyu kırmızıya boyayarak anormal dokudan ayırmasını sağlamaktadır. Serebral infarkt alanı boyut ve lokalizasyonu tayininde 1976’dan sonra kullanılmıştır. (31)

Biz bu çalışmamızda masif serebral iskemi modelini intraluminal pMCAO metodu ile erkek ratlarda değerlendirmeyi hedefledik. Bu modelde dekompresif kraniektominin optimal tedavi penceresini mortalite ve infarkt büyüklüğü üzerine etkisi ve KBB hasarı ilişkisinde sıkı bağlantı proteinleri olan occludin ve claudin-5 proteinlerinin spesifik rolünü değerlendirmeyi amaçladık .Aynı zamanda KBB geçirgenliğini değerlendirebilmek için beyin parankimine Evans Blue ve NaF perfuzyonunu ve serebral ödem miktarı için de serebral su miktarını ölçmeyi planladık.

III. MATERYAL METOD :

3.1: Hayvan Seçimi: Deney gruplarında 280-320 gr ağırlığında 10-12 aylık erkek Sprague Dawley ratlar işleme alındı. Ratlar işlem öncesi ve sonrasında takibi kafeslerde oda sıcaklığı (22-25°C)'nda 12 saat gündüz/12 saat gece sirkadien siklusu halinde izlendi.

3.2: Hayvanların beslenmesi: Normal diet ve suya erişimi deney sürecinde serbest bırakıldı.

3.3: Hayvan monitorizasyonu: Hayvanların iskemi ve dekompresif kraniektomi prosedürü öncesi – sırasında ve sonrasında Nimomed® Kızılötesi Termometre ile vücut sıcaklığı takip edildi.

3.4: Nörolojik disfonksiyon değerlendirilmesi: *SA. Menzies ve ark (59,66)* yaptığı çalışmada kullandığı nörolojik değerlendirme skorum yöntemi dekompresyon öncesi ve sakrifiyon öncesi 28.saatte takip edildi.

3.5: Malign Serebral İskemi Metodu: Malign serebral iskemi hasarı intraluminal yol ile permanent orta serebral arter okluzyonu (pMCAO-proximal Middle Cerebral Artery Occlusion)(58) ile yapılması planlandı. İşlem öncesi tüm ratlar anestezi için ketamin (4mg/100 g) ve xyalizen (1.5 mg/100 gr) 2/2 karıştırılıp ratların arka bacadan intramusküler enjekte edildi. İşlem yapılacak alan tıraşlanıp batikonla temizlendikten sonra 15 numaralı bisturi ucu ile orta hatta 2 cm'lik cilt kesisi yapıldı. Orta hat disseksiyonu sonrası sol sternokleidomastoid kası ekarte edilip altından sol CCA n.vagustan disseke edildi. CCA bifurkasyon yaklaşık 1-1.5 cm kadar öncesi proximalde 4.0 veya 3.0 naylon sutur ile bağlandı.CCAdan bifurkasyon sonra ECA ve ICA ayrımı saptandıktan sonra ECA disseke edilip mikroklemple ile klemlendi.ICA , sytilohyoid kas altında saptanarak gerektiğinde kas kesilerek klemlendi. CCA bifurkasyon origini distaline mikroklemple yerleştirildi. CCAda ince kesi yapılarak 4.0 Medium B MCAO silikon suturu yerleştirildi. (4-0 Medium B MCAO sutur L34 reusable ,Docol ®) CCA'daki sutur sabit tutularak ICA'daki mikroklemple çıkarıldı, kanama kontrolü ile sutur ICA'ya doğru ilerletildi.

Silikon suture 13-14 mm ilerletilerek MCA orijini okluzyonu sağlandı. ICA'ya suture stabilizasyonu amacıyla mikroklempt yerleştirildi. İşlem sonlandırıldı. Kesi yeri suture edilip batikonla silindi. İntraperitoneal 1cc serum fizyolojik enjeksiyonu sonrası işlem yapılan ratlar kafeslerine yerleştirildi.

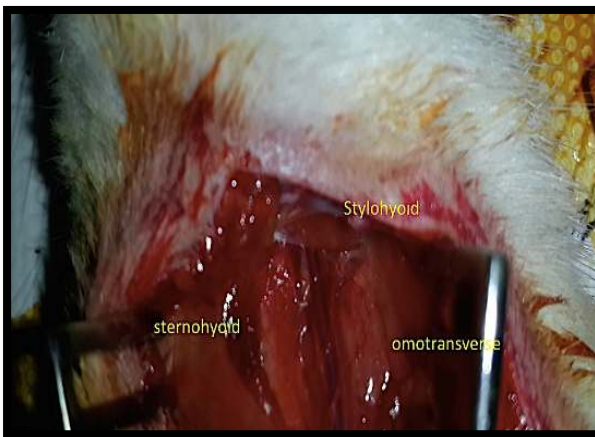
3.5.1 : İntraluminal pMCAO Yöntemi Açıklaması:



Açıklama:

İlk önce 15 numaralı bisturi ucu ile orta hatta 2 cmlik cilt kesisi yapıldı. Orta hat disseksiyonu sonrası sol sternokleidomastoid kası ekarte edildi.

RESİM 3.1: İntraluminal pMCAO Yöntemi-1



Açıklama:

Orta hat disseksiyonu sonrası sternokleidomastoid kas ekartasyonu sonrası Omotraverse ve Sternohyoid kas ekartasyonu ile CCA görüldü.

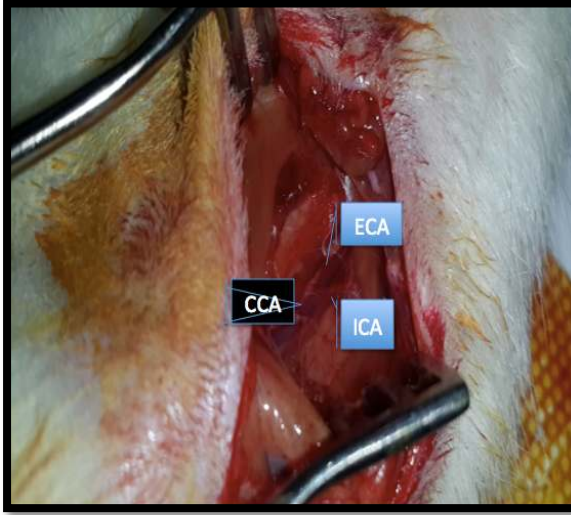
RESİM 3.2: İntraluminal pMCAO Yöntemi-2



Açıklama:

Bazı ratlarda yüksek bifurkasyon gözleendiği zaman Stylohyoid kas ekartasyonu ICA-ECA görülebilmesi için yapıldı.

RESİM 3.3: Intraluminal pMCAO Yöntemi-3



Açıklama:

Orta hat disseksiyonu sonrası sol sternokleidomastoid kası ekarte edilip altından sol komon karotis arter ve bifurkasyon ve ECA ve ICA dalları görüldü.

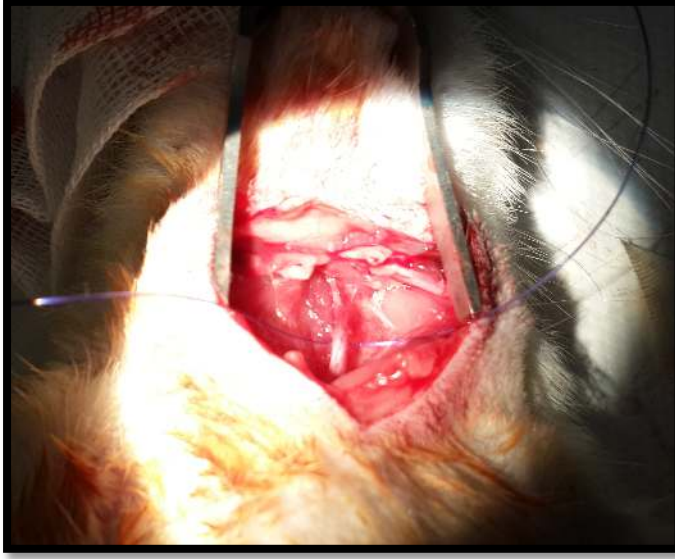
RESİM 3.4: Intraluminal pMCAO Yöntemi-4



Açıklama:

N.vagus ; CCA ve sonrasında ICA ile birlikte seyrettiği için CCA klemplemesi öncesi olası solunum arrestini önlemek için dikkatlice disseke edildi.

RESİM 3.5: Intraluminal pMCAO Yöntemi-5



Açıklama:

N.vagus'un CCA'dan disseksiyonu sonrası 4.0 prolene ile CCA proximalden bifurkasyona yaklaşık 10-15 mm uzaklıkta bağlandı.

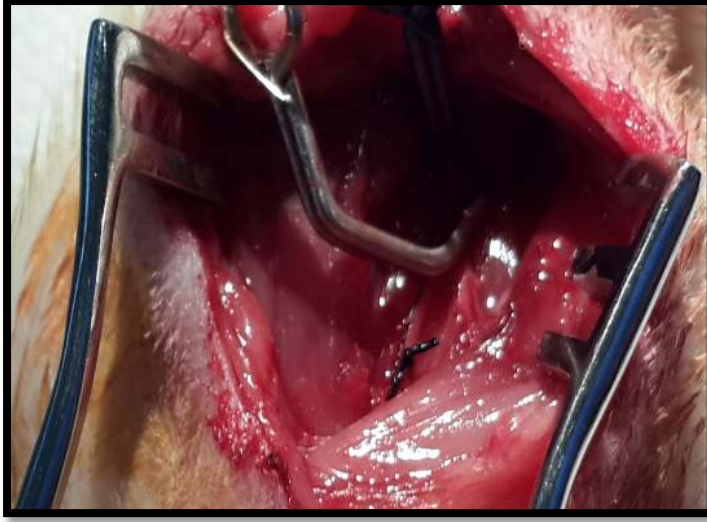
RESİM 3.6: Intraluminal pMCAO Yöntemi-6



Açıklama:

CCA bağlanması sonrası ECA dissekte edilip bifurkasyon orijininin 4.0 sutur ile bağlandı.

RESİM 3.7: Intraluminal pMCAO Yöntemi-7



Açıklama:

CCA bifurkasyon orijini distaline mikroklem্প yerleştirildi. Kanama kontrolü amacıyla ICA bifurkasyon orijinine mikroklem্প yerleştirildi. CCA'da ince kesi yapılarak silikon suture yerleştirildi.

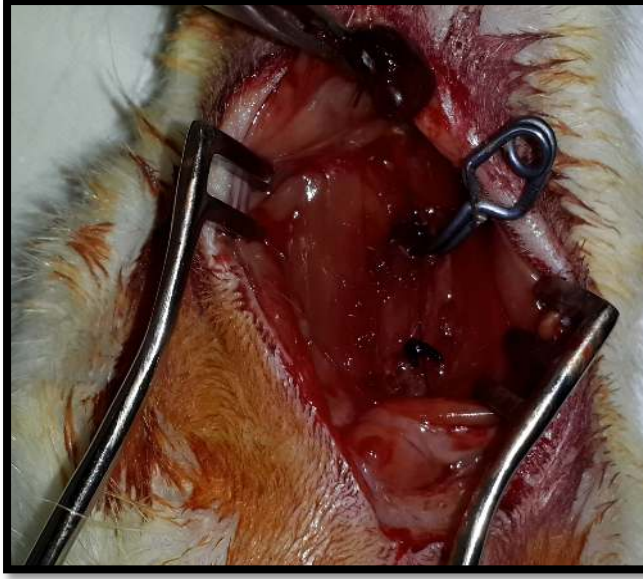
RESİM 3.8: Intraluminal pMCAO Yöntemi-8



Açıklama:

CCA'daki suture sabit tutularak önce distal CCA'daki sonra ICA'daki mikroklem্প çıkarıldı; kanama kontrolü ile suture ICA'ya doğru ilerletildi. Silikon suture 13-14 mm ilerletilerek MCA orijini okluzyonu sağlandı.

RESİM 3.9: Intraluminal pMCAO Yöntemi-9



Açıklama:

CCA'daki sutur sabit tutularak önce distal CCA'daki sonra ICA'daki mikroklempt çıkarıldı kanama kontrolü ile sutur ICAYA doğru ilerletildi. Silikon sutur 13-14 mm ilerletilerek MCA origini okluzyonu sağlandı.

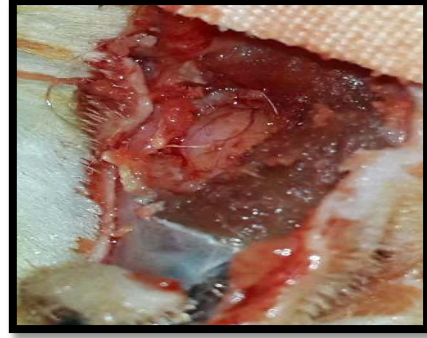
RESİM 3.10: Intraluminal pMCAO Yöntemi-10



RESİM 3.11-12: Intraluminal pMCAO Yöntemi-11,12

Açıklama: ICA'ya sutur stabilizasyonu amacıyla mikroklempt yerleştirildi. İşlem sonlandırıldı. Kesi yeri suture edilip batikonla silindi. İntraperitoneal 1cc serum fizyolojik enjeksiyonu sonrası işlem yapılan ratlar kafeslerine yerleştirildi.

3.6: Dekompresif Kraniektomi (DC) : Parietal ve temporal bölgede 10x5 mm boyutlarında kemik flep kaldırılması ile kraniektomi yapıldı. İşlem sırasında beyin doku rezeksiyonu yapılmadı. Prosedür sonunda temporal kas ve deri flebi yerine suture edildi. (32,33)



RESİM 3.13,14: Dekompresif Kraniektomi İşlemi -1,2

3.7: Çalışma Grupları: Çalışmamızda dört grup olması planlandı. Sham grubu hariç tüm gruplarda serebral iskemi prosedürü uygulandı. Literatürdeki diğer çalışma örnekleri incelendiğinde KBB bifazik açılma teorisine göre erken dekompresyon saati 4.saat ve geç dekompresyon saati 24.saat olarak alınmıştır.(17,33,35,57) Serebral iskemi sonrası 24-48 saatlerinde serebral ödem maksimum olmaktadır.(35,36,50) Bu yüzden ratların sakrifişyonunu 28.saat olarak planlandı. İnfarkt volum ,serebral ödem ,kan beyin bariyeri geçirgenliği ve kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi şeklinde 4 işlem değerlendirilmesi yapıldı.

***İstatistiksel analiz: %90 power değeri için 0.05 anlamlık düzeyinde rat sayısı %3'lük yanılma payı ile n:5 olarak hesaplandı. Toplam rat sayısı 64 olarak hesaplandı. Sham ve kontrol grup rat sayılarında anlamlık oranı düşük hesaplandı.

***Hayvan sayıları deney için planlanan işlemler için ayrı ayrı hesaplandı. Çünkü her işlem için farklı beyin örneği gerekmektedir; aynı beyinden tüm işlemlerin yapılması teknik olarak mümkün değildir.

Sham Grup:	Pseudo cerrahi işlem yapılacak grup: <u>Yapılacak işlemler:</u>	Sham grubunda her farklı işlem için n:3; toplamda n:12
	a-serebral ödem değerlendirilmesi	n:3
	b-serebral iskemik infarkt alanı hesaplanması	n:3
	c-kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlendirilmesi	n:3
	d-kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi	n:3
Kontrol Grubu :	Sol pMCAO sonrası dekompresif kraniektomi yapılmayan grup <u>Yapılacak işlemler:</u>	Kontrol grubunda her farklı işlem için n:3 ; toplamda n:12
	a-serebral ödem değerlendirilmesi	n:3
	b-serebral iskemik infarkt alanı hesaplanması	n:3
	c-kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlendirilmesi	n:3
	d-kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi	n:3
Deney Grubu 1:	Sol pMCAO sonrası dekompresif kraniektomi 4.saattte yapılan grup <u>Yapılacak işlemler:</u>	Deneyssel gruplarda her farklı işlem için n:5 ; toplam n:20
	a-serebral ödem değerlendirilmesi	n:5
	b-serebral iskemik infarkt alanı hesaplanması	n:5
	d-kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi	n:5
Deney Grubu 2:	Sol pMCAO sonrası dekompresif kraniektomi 24.saatte yapılan grup <u>Yapılacak işlemler:</u>	Deneyssel gruplarda her farklı işlem için n:5 ; toplam n:20
	a-serebral ödem değerlendirilmesi	n:5
	b-serebral iskemik infarkt alanı hesaplanması	n:5
	c-kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlendirilmesi	n:5
	d-kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi	n:5

TABLO 3.1: Çalışma Grupları

3.8: Değerlendirilen İşlemler:

3.8.1: Serebral Ödem: Serebral ödem *Adachi* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda (60) kullandığı metodoloji ile ölçüldü. Disseksiyon sonrası öncelikle yaş ağırlıkları hassas terazide (Precisa®) tartıldı. Patoloji laboratuvarında 105 °C ‘de 24 saat etüvde (Nüve®) kurutulduktan sonra , kuru ağırlık hassas terazide (Precisa®) tartıldı.

Sonuçta ,ödem volumu şu formülle hesaplandı:

$$\left(\frac{\text{(Yaş ağırlık – Kuru ağırlık)}}{\text{Yaş ağırlık}} \right) \times 100 \%$$

3.8.2: Serebral iskemik infarkt büyüklük hesaplanması: Rat iskemi deneysel çalışmalarında kullanılan yöntemle hesaplandı. (61) İskemi sonrası sakrifiye edilen ratların çıkarılan beyinleri koronal 2 mm incelikte kesitlere ayrıldı. Kesitler %2’lik TTC solusyonunda 37°C’de 15 dk bekletildi ve ardından %10 formalin nötral tampon solusyonunda (ph:7.4) fiks edildi. Boyanmayan kesitler iskemik infarkt alanları olarak değerlendirildi. Serebral infarkt hacmi hesaplanması Adobe photoshop CS5 extended (version 12.1-64 bit) programında yapıldı.

3.8.3: Kan beyin bariyeri geçirgenliği değerlendirilmesi: Kan beyin bariyeri geçirgenliği *Lenzser* ve arkadaşlarının (62) çalışmalarında uygulandığı yöntem ile değerlendirilmesi planlandı. İşlem yapılmayan sağ tarafta lateral insizyonla sternoklaidomastoid kas ile skalen kaslar arasında juguler ven disseke edildi. Sağ juguler ven 26G mor renkli kanül ile kataterize edildi. Sakrifiye öncesi ratlara Evans Blue (%2lik 4ml /kg) ve NaF (%2lik 4ml /kg) 30 dk önce sağ juguler venden iv infuze edildi. İnfüzyon sonunda 30 dk bekledikten sonra ;iv juguler ven yolu ile buzlu soğuk heparinize fosfat tamponlu serum fizyolojik verildi. Bilateral femoral arter kesilerek dolaşımdan hızlı NaF/EB boyalarının

yıkanması sağlandı. Femoral venden sağ juguler venden infuze edilen serum fizyolojik gelene kadar yıkama işleminde devam edildi.



RESİM 3.15,16 : Ratlarda Sağ Juguler Ven Kataterizasyonu-1,2

Açıklama: İşlem yapılmayan sağ tarafta lateral insizyonla sternoklaidomastoid kas ile skalen kaslar arasında juguler ven disseke edildi.Sağ juguler ven 26G mor renkli kanül ile kataterize edildi.28.saatte sakrifasyon öncesi sıçanlara önce NaF (%2lik 4ml /kg) sonra Evans Blue (%2lik 4ml /kg) sağ juguler venden hayvanlarda kardiyak yüklenme olasılığı nedeni ile yavaş iv infuze edildi.



RESİM 3.17,18 : Ratlarda EB/ NaF Boyaması -1,2

Açıklama: NaF/EB iv juguler ven infuzyonu sonrası ratlarda göz küreleri sarımsı, idrar çıkışı sarımsı floresans renkte gözlemlendi.



RESİM 3.19,20: Ratlarda Sağ Juguler Ven Kataterizasyonu-19,20

Açıklama:

NaF/EB iv infuzyon sonrası 30 dk beklendi. İnfüzyon sonunda iv juguler ven yolu ile buzlu soğuk heparinize fosfat tamponlu serum fizyolojik verildi. Bilateral femoral arter kesilerek dolaşımdan hızlı NaF/EB boyalarının yıkanması sağlandı. Femoral venden sağ juguler venden infuze edilen serum fizyolojik gelene kadar yıkama işlemine devam edildi. *Sağdaki resimde rat iç organlarındaki boyanma görülmektedir.



Açıklama:

Deney-2 grubundan Soldaki resim NaF/ EB boyaması sonrası makroskopik rat beyin örneği ;sağdaki ise boyama olmayan makroskopik rat beyin örneği

RESİM 3.21: EB/NaF Boyama Makroskopik Rat Beyin Örneği

Sakrifiye edilip beyinler çıkarıldıktan sonra floresans spektrofotometrik inceleme için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına dokular teslim edildi. Biyokimya laboratuvarında anestezi altında ratlardan alınan beyinler çalışma gününe kadar -80°C de bekletildi. Evans blue ölçümü için örnekler %50'lik TCA (triklosetik Asit) ile homojenize edildi. Elde edilen homojenizat 10000 g de 20 dk +4°C de santrifüj edildi. Süpernatant etanol ile 1/3 dilüe edildi. 100µl alınarak floresan plate de 620/680 nm (eksitasyon/emisyon dalga boyu) de mikropate okuyucuda ölçüldü (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo, USA). Standart olarak %50 TCA/ etanol (1:3) de çözünmüş Evans Blue kullanıldı (6-12,5-25-50-100-200-400-800

ng/ml). NaF ölçümü için kalan homojenizata 5 mol/ L hazırlanmış olan NaOH eklendi (1:0,8). 100µl alınarak floresan plate de 440/525 nm (eksitasyon/emisyon dalga boyu) de mikropate okuyucuda ölçüldü (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo, USA). Standart olarak aynı çözücude çözünmüş olan NaF kullanıldı. (5-10-20-40-80-160 ng/ml). Sonuçlar her iki boyama için de 1 gram doku başına düşen miktar ng/ml olarak hesaplandı.

3.8.4: Kan beyin bariyeri disfonksiyonu değerlendirilmesi:

Serebral iskemi sonucu kan beyin bariyeri yıkılarak serebral ekstrasvazasyonu arttırmakta ve olay vazojenik ödem ile sonuçlanmaktadır. Kan beyin bariyeri yıkım ürünleri ; sıkı bağlantı molükülleri claudin-5 ve occludin ,basal lamina proteinleri laminin,heparan sulfat ve fibronektinden oluşmaktadır . Biz bu çalışmada kan beyin bariyeri geçirgenliği disfonksiyonunu sıkı bağlantı molekülleri occludin ve claudin -5 proteinlerinin miktarının gruplar arası değişikliğini western blot yöntemi ile değerlendirildi. Western Blot tekniği antikora dayalı protein identifikasyonu sağlayan bir tekniktir. Bu teknikle gruplar arasındaki Occludin ve Claudin-5 proteinlerinin miktarları arasındaki değişim gösterilmiştir. Occludin ve Claudin-5 proteinlerinin miktarı ; KBB hasarlanmış yada ortadan kalkmış olan gruplarda azalır. Western Blot tekniğinin çalışma prensibi temel olarak SDS-PAGE (4-12%) ile jelde yürütülen beyin lizatlarından elde edilen toplam protein ekstresinin antikor uygulama için kullanılan bir membrana (PVDF) aktarılaraq antikor bağlanma reaksiyonlarını takip eden görüntüleme reaksiyonlarının bütününden oluşur. Çalışmada ticari olarak elde edilen Occludin (Invitrogen®) ve Claudin-5 (Invitrogen®) antikorları 1:1000 dilüsyon oranında kullanılarak membran (PVDF) üzerine aktarılan toplam proteinden Occludin ve Claudin-5 miktarı tespit edildi.

Örnek başına toplam 2µg/µl olarak toplamda 25µl alınan örnekler jelde yürütüldükten sonra membrana (PVDF) aktarıldı ve daha sonra membran, her bir proteini belirlemek için diğer geri kalan proteinleri bloklamak için %5'lik, Tris-buffered saline tampon içerisinde hazırlanmış Skim-Milk Powder (Sigma®) ile 1 saat inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra miktarını karşılaştıracığımız antikor 1:1000 oranında eklendi ve gece boyunca +4°C'de

inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra antikor görüntülemeye kullanılan ikinci antikor da 1:5000 oranında eklendikten sonra kemilüminesans görüntüleme için enzim ve substrat (Santa Cruz®) eklenip görüntüleme yapıldı. Görüntüler Image J programı ile analiz edildi.

Western Blot analizi; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında yapıldı.

3.9: Sakrifasyon İşlemi: Prosedür sonrası ratlar 28.saatte kardiak kan alınması ile sakrifiye edilmesi planlandı. Sakrifikasyonu takiben beyin dokuları mümkün olduğunca atravmatik olarak boyundan başlayan diseksiyon ile kafatasından çıkarıldı ve beyin dokuları değerlendirilecek parametreler için hazırlandı.

3.10: Etik Kurul Onayı: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarında yürütülen çalışma için Yerel Etik Kurul'dan 2014/119 no'lu kurul onayı alınmıştır.

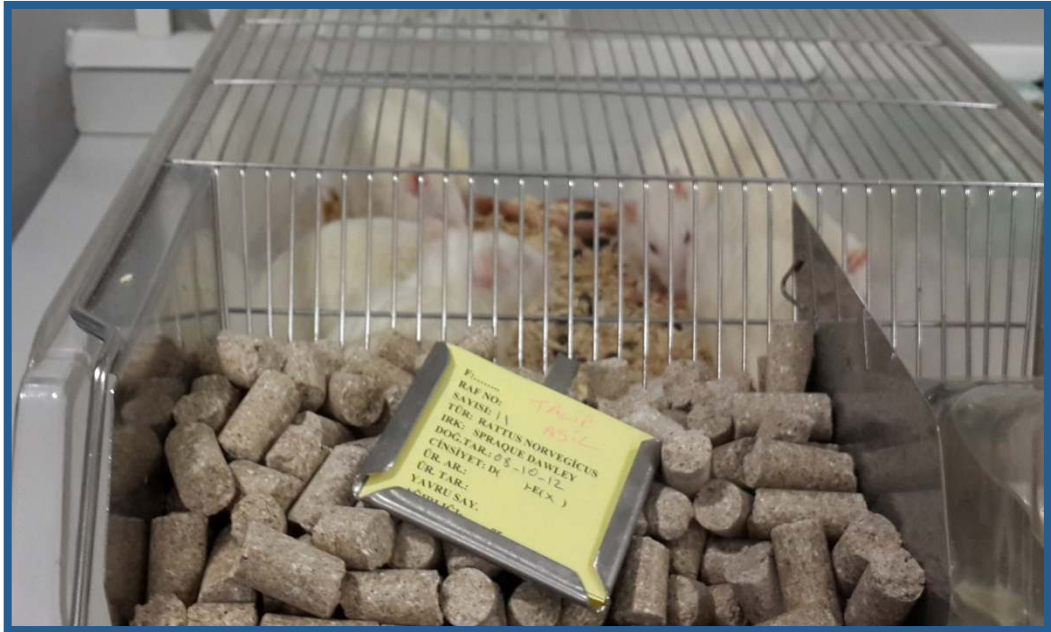
IV. SONUÇLAR:

4.1: MORTALİTE:

Deney gruplarında 70 adet 280-320 gr ağırlığında 10-12 aylık erkek Spraque Dawley rat çalışmaya dahil edildi. Ratların işlem öncesi ve sonrasında takibi kafeslerde oda sıcaklığı (22-25°C)'nda 12 saat gündüz/12 saat gece sirkadien siklusu halinde izlendi. Hayvanların beslenmesi normal diyet ve suya erişimi deney sürecinde serbest bırakıldı.

4 rat (Kontrol grubundan 2 ve Deney-2 grubundan 2) juguler ven kataterizasyonu ile NaF/EB boyanması işleminde ve 2 rat (Kontrol grubundan) pMCAO işlemi sırasında arrest (CCA klemplenmesi sırasında N.vagus'un birlikte klemlenmesi sonucu komplikasyon) olduğu için çalışmadan çıkarıldı.

Kontrol grubundaki 1 rat MCAO işlemi sonrası 24.saatte ex oldu.



RESİM 4.1: Hayvanların Beslenmesi ve Monitorizasyonu-1

Açıklama: Ratlar kafeslerinde oda sıcaklığında(22-25°C) sirkadien ritme uygun, normal diyet beslenmesi ile takip edildi.



RESİM 4.2,3: Hayvanların Beslenmesi ve Monitorizasyonu-2,3

Açıklama: Infarkt volume etkileyen faktörlerden vucut sıcaklığı da olduğu için ratların pre-postop normotermide tutulması sağlandı.

4.2: NÖROLOJİK SKOR:

SA. Menzies ve ark (66) yaptığı çalışmada kullandığı nörolojik değerlendirme skorumla yöntemi ile dekompresyon öncesi ve sakrifiye öncesi 28.saatte değerlendirildi.

TABLO 4.1: Ratlarda Nörolojik Muayene Skoruması :

Skor 0	Defisit yok
Skor 1	Kontralateral ön ayak fleksiyonu
Skor 2	Kuyruk çekilmesi ile kontralateral ön ayak yakalama gücü azlığı
Skor 3	Spontan hareket var ;ama kuyruk çekilmesi ile kontralateral daire çizimi
Skor 4	Kontralateral daire çizimi
Skor 5	Ölüm



Açıklama:

Kontrol grubundan 28. Saatte nörolojik muayenesi yapılan rat. Nörolojik muayene Skor:3 (Çevresinde daire çizerek hareket etmekte idi.)

RESİM 4.4: Rat Nörolojik Muayene Örneği

TABLO 4.2: Her 4 Grup için Ayrı Skorlanmış Nörolojik Muayene Değerlendirilmesi:

Deney grupları:	Dekompresyon öncesi:	28.saat (sakrifiyon öncesi) :
D1-1 (TTC grubu)	0	0
D1-2 (TTC grubu)	1	1
D1-3 (TTC grubu)	2	2
D1-4 (TTC grubu)	1	1
D1-5 (TTC grubu)	0	0
D2-1 (TTC grubu)	2	2
D2-2 (TTC grubu)	4	4
D2-3 (TTC grubu)	2	2
D2-4 (TTC grubu)	3	3
D2-5 (TTC grubu)	4	4
K-1 (TTC grubu)	-	3
K-2 (TTC grubu)	-	4
K-3 (TTC grubu)	-	5
S-1 (TTC grubu)	-	0
S-2 (TTC grubu)	-	0
S-3 (TTC grubu)	-	0
D1-1 (SE grubu)	0	0
D1-2 (SE grubu)	2	2
D1-3 (SE grubu)	1	1
D1-4 (SE grubu)	1	1
D1-5 (SE grubu)	0	0
D2-1 (SE grubu)	2	2
D2-2 (SE grubu)	3	4
D2-3 (SE grubu)	2	3
D2-4 (SE grubu)	3	3

D2-5 (SE grubu)	4	4
K-1 (SE grubu)	-	3
K-2 (SE grubu)	-	3
K-3 (SE grubu)	-	4
S-1 (SE grubu)	-	0
S-2 (SE grubu)	-	0
S-3 (SE grubu)	-	0
D1-1 (WB grubu)	0	0
D1-2 (WB grubu)	1	1
D1-3 (WB grubu)	2	2
D1-4 (WB grubu)	1	1
D1-5 (WB grubu)	0	0
D2-1 (WB grubu)	2	2
D2-2 (WB grubu)	4	4
D2-3 (WB grubu)	2	2
D2-4 (WB grubu)	3	3
D2-5 (WB grubu)	4	4
K-1 (WB grubu)	-	3
K-2 (WB grubu)	-	3
K-3 (WB grubu)	-	4
S-1 (WB grubu)	-	0
S-2 (WB grubu)	-	0
S-3 (WB grubu)	-	0
D1-1 (NaF/EB grubu)	0	0
D1-2 (NaF/EB grubu)	1	2
D1-3 (NaF/EB grubu)	2	2
D1-4 (NaF/EB grubu)	0	1
D1-5 (NaF/EB grubu)	0	0
D2-1 (NaF/EB grubu)	2	3
D2-2 (NaF/EB grubu)	3	4
D2-3 (NaF/EB grubu)	2	3
D2-4 (NaF/EB grubu)	3	4
D2-5 (NaF/EB grubu)	4	4
K-1 (NaF/EB grubu)	-	3
K-2 (NaF/EB grubu)	-	4
K-3 (NaF/EB grubu)	-	4
S-1 (NaF/EB grubu)	-	0
S-2 (NaF/EB grubu)	-	0
S-3 (NaF/EB grubu)	-	0

(Açıklama: TTC grubu: Serebral infarkt volum hesaplanan grup ; **SE grubu:**

Serebral Ödem (SE) hesaplanan grup ; **WB grubu :** Occludin ve Claudin-5

proteinlerinin Western Blot (WB) analizi ile değerlendirilen grup ; **NaF / EB**

grubu: KBB geçirgenliğinin NaF ve EB boyaması ile değerlendirilen grup .)

Erken dekompresif kraniektomi olan grupta nörolojik muayene skorlaması geç dekompresif kraniektomi olan gruba ve kontrol grubuna göre daha düşük idi.

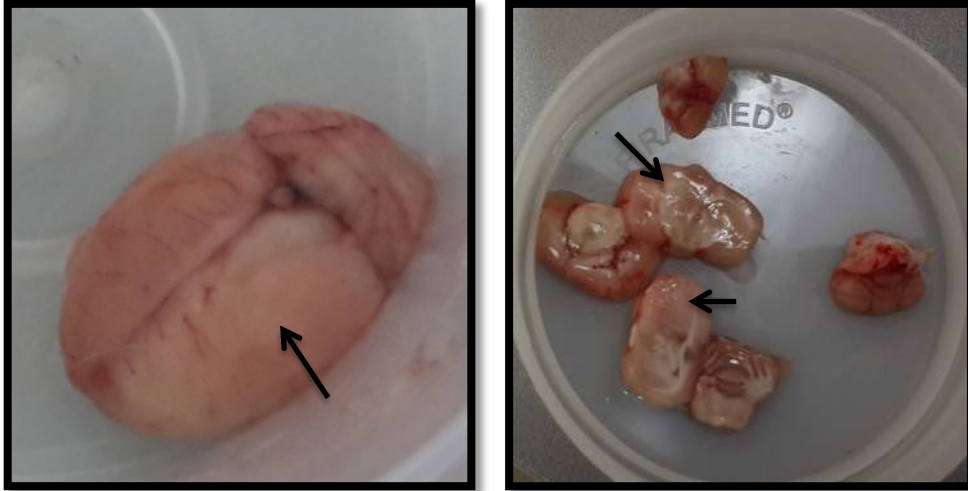
Kontrol grubundaki 1 rat MCAO işlemi sonrası 24.saatte ex oldu.

4.3: SEREBRAL ÖDEM DEĞERLENDİRİLMESİ:

Serebral ödem beyin su hacmi hesaplaması ile ölçüldü (60) . Disseksiyon sonrası öncelikle yaş ağırlıkları hassas terazide (Precisa®) tartıldı. Patoloji laboratuvarında 105 °C ‘de 24 saat etüvde (Nüve®) kurutulduktan sonra ,kuru ağırlık hassas terazide tartıldı

Sonuçta ,ödem volumu şu formülle hesaplandı:

$$\left(\frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Yaş ağırlık}} \right) * 100 \%$$



RESİM 4.5,6: Rat pMCAO sonrası Serebral Ödem Makroskopik Örnek-1,2

Açıklama: Kontrol grubundan beyin disseksiyonu sonrası (sol taraftaki) ve 2 mm kesitlere alındıktan sonraki (sağ taraftaki) örnekler. Sol MCAO yapılan tarafta geniş serebral ödem (siyah oklarla işaretlenmiştir) görülmektedir.

TABLO 4.3: Beyin Su Hacmi Değerleri

	Yaş ağırlık (gr)	Kuru ağırlık (gr)	Fark (gr)	% Fark
D1.1	2,322	0,587	1,735	74,72
D1.2	1,987	0,453	1,534	77,2
D1.3	2,009	0,484	1,525	75,9
D1.4	2,123	0,581	1,542	72,63
D1.5	2,012	0,493	1,519	75,49
D2.1	2,502	0,504	1,998	79,85
D2.2	2,132	0,472	1,660	77,86
D2.3	1,998	0,493	1,505	75,32
D2.4	2,208	0,489	1,719	77,85
D2.5	2,156	0,476	1,680	77,92
K1	1,952	0,425	1,527	78,22
K2	2,095	0,527	1,568	74,84
K3	2,165	0,603	1,562	72,14
S1	2,178	0,498	1,680	77,13
S2	2,217	0,518	1,655	74,65
S3	2,145	0,535	1,610	75,05

Beyin su içeriği ; erken dekompresif kraniektomi yapılan grupta ortalama % 75.49± 1.69 , geç dekompresif kraniektomi yapılan grupta %77.86±1.60 , kontrol grubunda % 74.84 ±3.04 ve sham grubunda %75.09 ± 1.33 idi.

Erken ve geç dekompresif kraniektomi yapılan grupların karşılaştırılmasında beyin su hacmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (p=.178)

Deneyde yer alan gruplar arasında dekompresif kraniektomin erken dönemde yapılması ile ilişkili istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

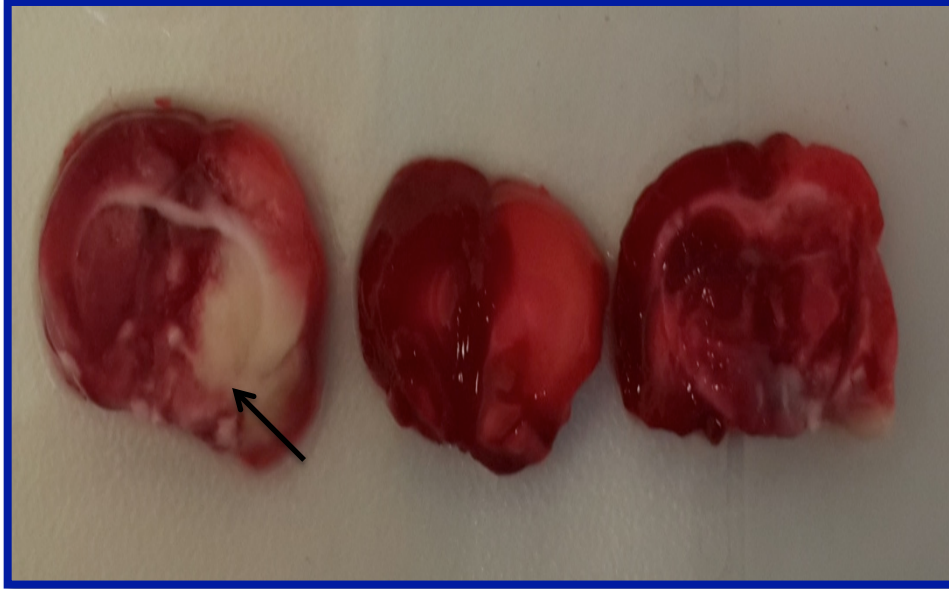
4.4: İNFARKT HACMİ:

Serebral infarkt hacmi hesaplanması Adobe photoshop CS5 extended (version 12.1-64 bit) programında yapıldı.



RESİM 4.7 : Sham Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği

Açıklama: Sham Grubundan TTC boyaması sonrası 2 mmlik kesitler



RESİM 4.8 : Kontrol Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği

Açıklama: Kontrol grubundan TTC boyaması sonrası 2 mmlik kesitler. Beyaz (okla gösterilen) alanlar TTC ile boyanmayan infarkt alanine göstermektedir.



RESİM 4.9 : Erken DC Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği

Açıklama: Erken DC grubundan TTC boyaması sonrası 2 mmlik kesitler. Beyaz (okla gösterilen) alanlar TTC ile boyanmayan infarkt alanını göstermektedir.



RESİM 4.10 : Geç DC Grubu TTC boyama Makroskopik Örneği

Açıklama: Geç DC grubundan TTC boyaması sonrası 2 mmlik kesitler. Beyaz (okla gösterilen) alanlar TTC ile boyanmayan infarkt alanını göstermektedir.

TABLO 4.4: İnfarkt Volum (mm³) Değerleri:

	İnfarkt Volum(mm ³)
D1.1	61,598
D1.2	93,544
D1.3	152,304
D1.4	2,482
D1.5	36,978
D2.1	351,636
D2.2	1400,542
D2.3	245,228
D2.4	484,136
D2.5	404,358
K1	242,716
K2	436,252
K3	675,074

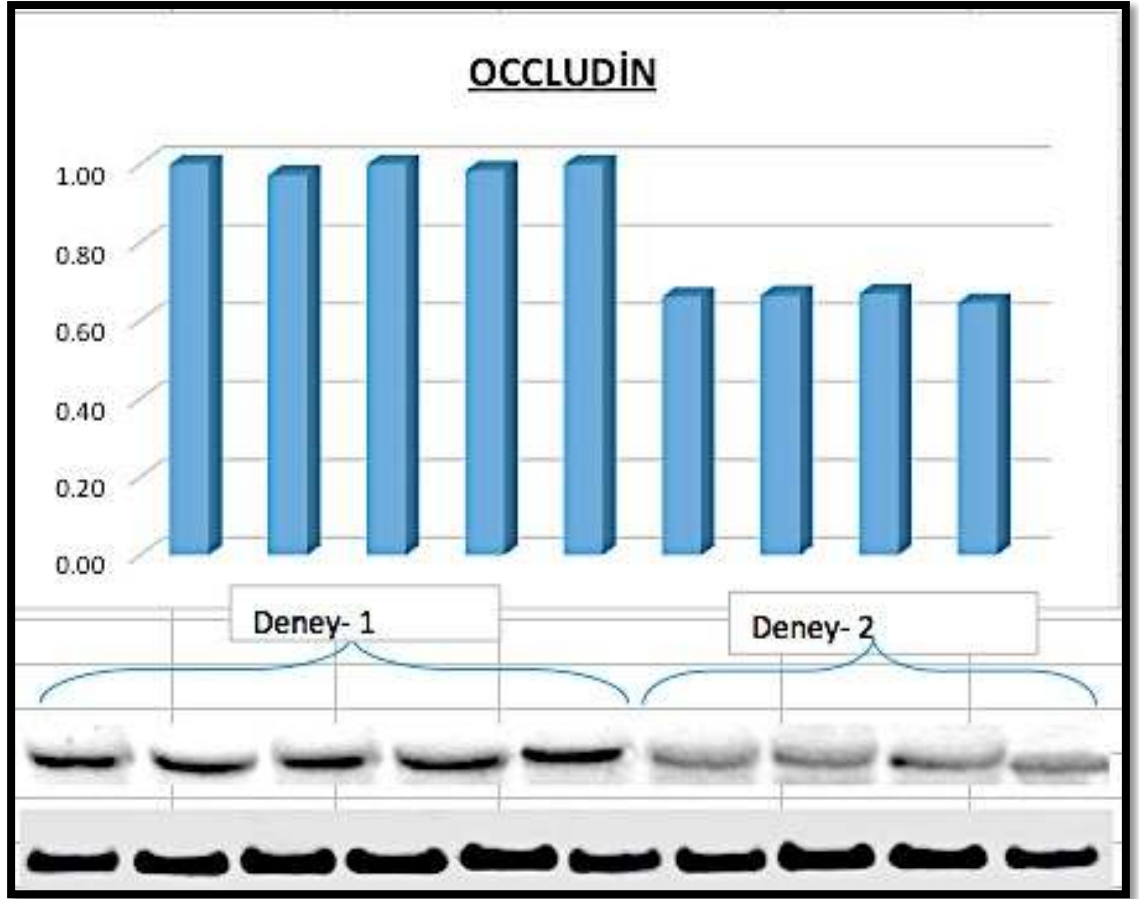
Erken dekompresif kraniektomi yapılan grupta ortalama infarkt volum $69,98 \pm 57,1 \text{ mm}^3$, geç dekompresif kraniektomi yapılan grupta $577,18 \pm 468,37 \text{ mm}^3$ ve kontrol grubunda ise $451,347 \pm 216,573 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı.

Erken dekompresif kraniektomi yapılan grubunda istatistiksel olarak infarkt volumunda anlamlı azalma mevcuttu. ($p=.014$)

4.5: KAN BEYİN BARIYERİ DEĞERLENDİRİLMESİ:

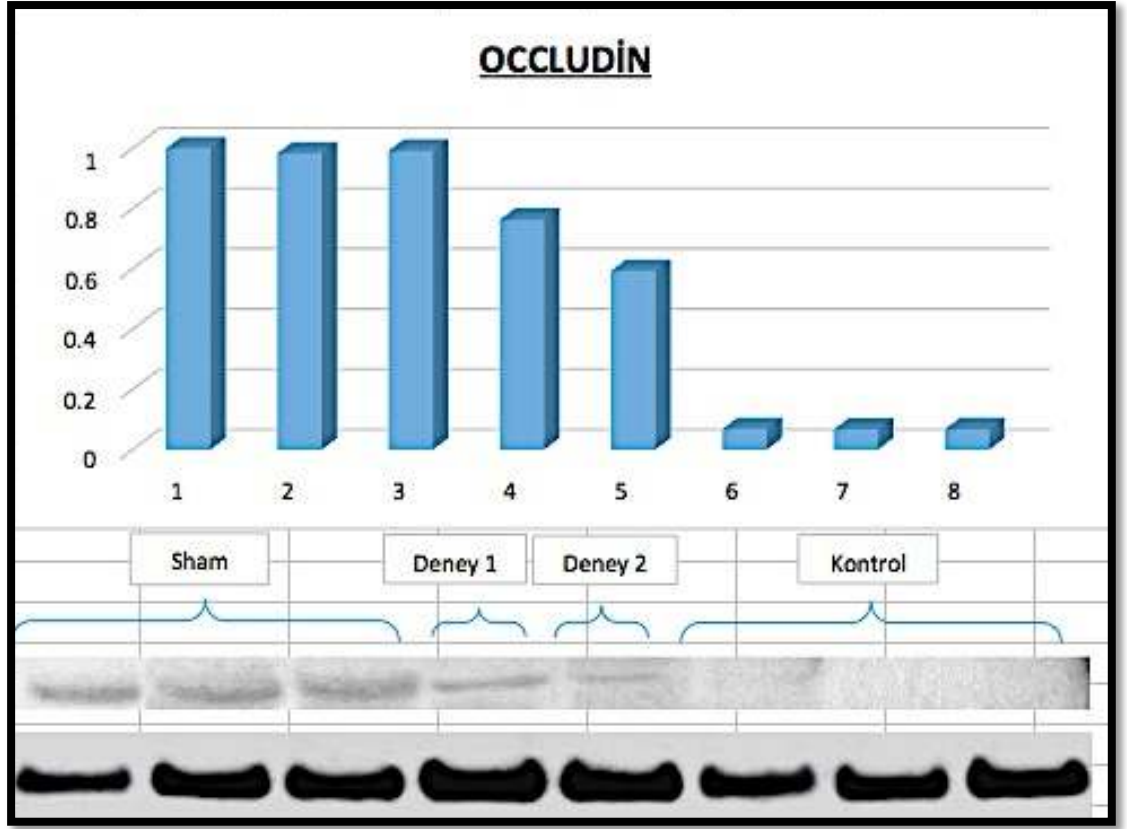
4.5.1: Occludin ve Claudin-5 Ekspresyonu:

Occludin ve claudin-5 sıkı bağlantı proteinlerinin ; dekompresif kraniektomi yapılan grupta ; geç dekompresif kraniektomi yapılan grupla karşılaştırıldığında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterildi. (occludin için $p=.013$; claudin-5 için $p=.034$)



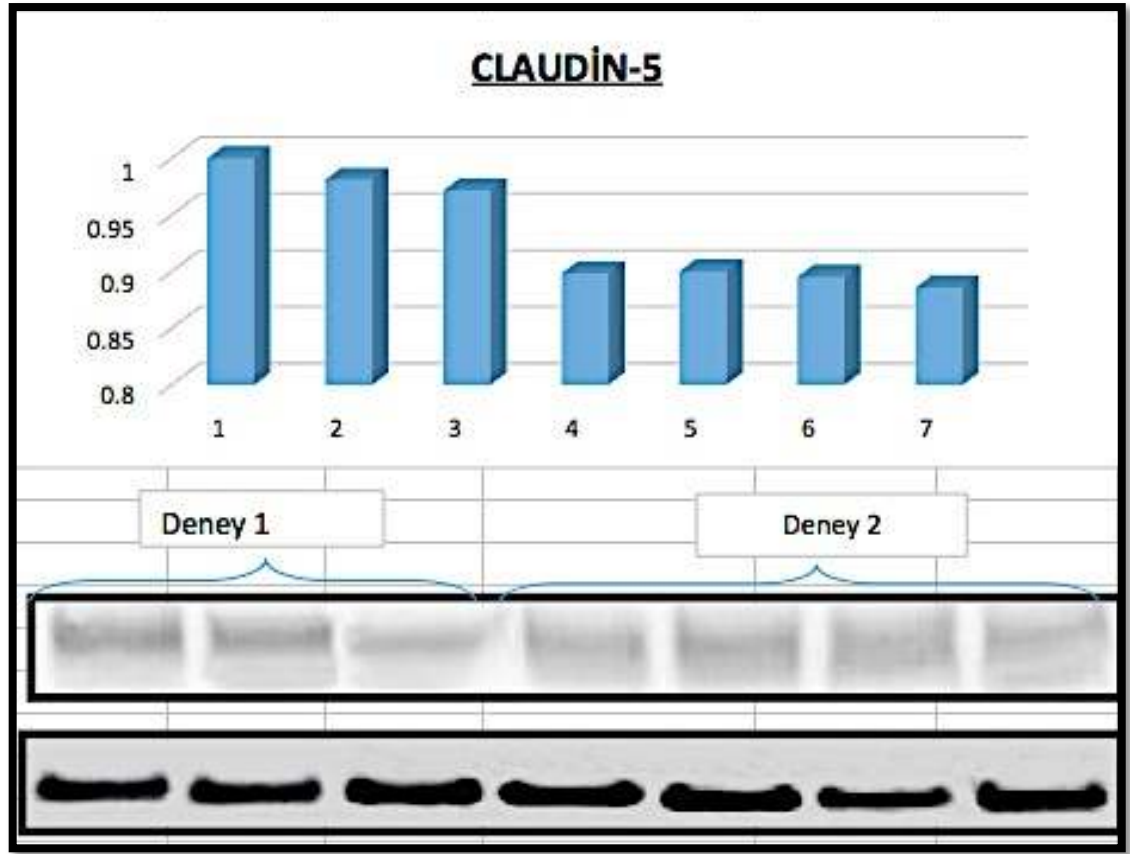
TABLO 4.5: Erken DC Grubunda Occludin Ekspresyonu Western Blot analizi

Açıklama: Erken DC grubunda Occludin ekspresyonu Geç DC grubuna göre daha yüksek oranda saptanmıştır.



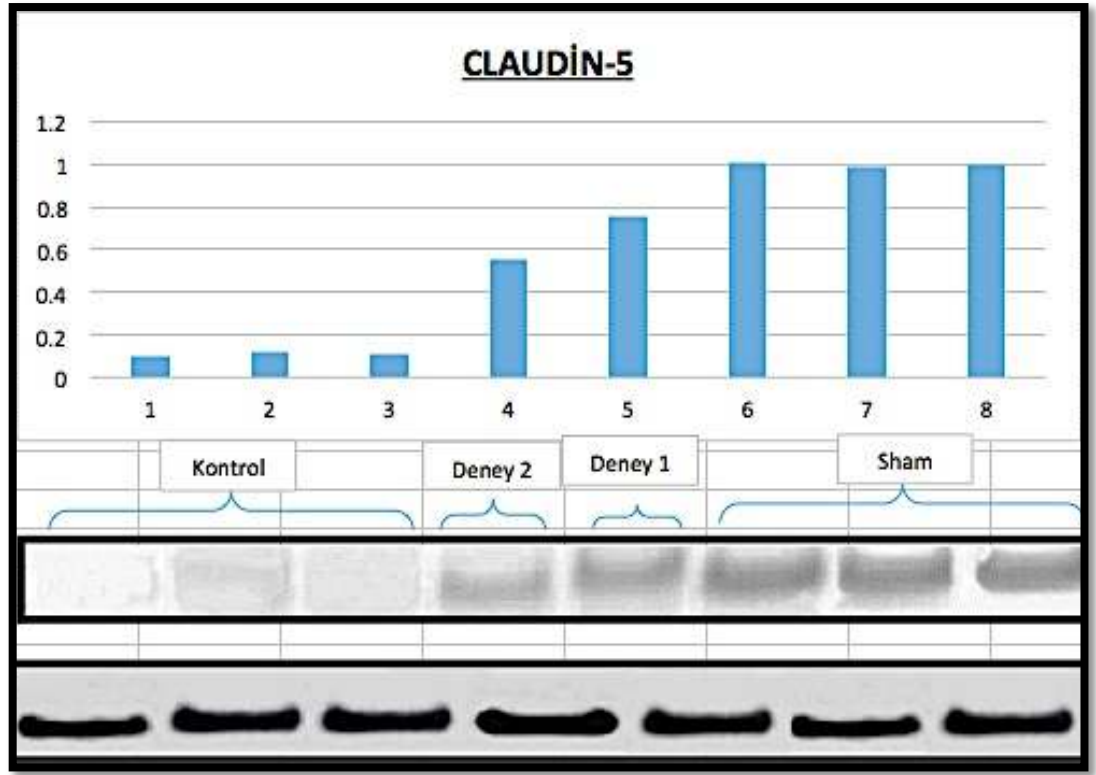
TABLO 4.6 : Occludin Ekspresyonu Western Blot analizi

Açıklama: Erken DC grubunda Occludin ekspresyonu diğer gruplara göre daha yüksek oranda saptanmıştır.



TABLO 4.7: Erken DC Grubunda Claudin-5 Ekspresyonu Western Blot analizi

Açıklama: Erken DC grubunda Claudin-5 Ekspresyonu Geç DC grubuna göre daha yüksek oranda saptanmıştır.



TABLO 4.8: Claudin-5 Ekspresyonu Western Blot analizi

Açıklama: Erken DC grubunda Claudin-5 ekspresyonu diğer gruplara göre daha yüksek oranda saptanmıştır.

4.5.2: NaF –EB BOYAMA:

TABLO 4.9: EB ve NaF Boyalarının Spektrofotometrik Değerleri

	EVANS BLUE (ng/ml)	NaF (ng/ml)
S-1	12,03037326	46,80188902
S-2	12,32876712	17,76770261
S-3	9,580838323	13,57962185
K-1	4,383099915	13,63023131
K-2	10,96985368	18,06267793
K-3	11,52194636	6,911031386
D1-1	8,415173527	22,58896079
D1-2	4,863456743	9,537316358
D1-3	4,850942639	14,08785435
D1-4	10,96616789	7,265832975
D1-5	11,69971293	11,10202775
D2-1	4,180577627	7,934398787
D2-2	9,761303138	15,62381574
D2-3	12,11987029	8,11869807
D2-4	6,161219704	8,358467652
D2-5	15,36193953	12,65223245

Yukarıdaki tabloda 1 gr beyin dokusundaki EB ve NaF KBB'den ektravazasyon değerleri verilmiştir.

Gruplar arasında NaF ve EB boyaması arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. (EB için $p=.274$; NaF için $p=.284$)

4.6. İSTATİSTİK VERİ:

İstatistik veriler SPSS 16.0 version 64 bit programda ; ANOVA, Kruskal-Wallis test kullanılarak elde edilmiştir. ($p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)

V.TARTIŞMA:

Supratentorial infarktların %10-15'i orta serebral arter (MCA) sulama alanını tamamıyla etkilemektedir. Yaklaşık %13 hastada ciddi serebral ödem ve herniasyon gelişmektedir .Bu hastaların yaklaşık %7'si ilk haftada beyin ödemi komplikasyonu ile kaybedilmektedir. Hastalarda optimal tedavi verilmesine rağmen mortalite-morbidite oranı %80 üzerindedir. (13,14,15,16)

Malign MCA infarktı kavramı MCA sulama alanındaki iskemik hasar sonucu serebral ödem gelişimi sonrası ortaya çıkan hızlı nörolojik durum kötüleşmesi tanımlamaktadır. Malign MCA infarktı belirteçleri MCA sulama alanının >%50 'sinden fazla iskemik alan olması ,hastalarda erken dönemde bulantı-kusma – gelişmesi ,hastaların semptomlar başlamasından ilk 6 saatte sol MCA infarktlarında NIHSS skorları ≥ 20 ; sağ MCA infarktlarında NIHSS ≥ 15 olması ,DWI (diffusion weighted imaging)'da iskemik alan hacminin $>145 \text{ cm}^3$ 'den büyük olması ile sıralanabilir. (63)

Malign MCA infarktlarında tedavi seçenekleri agresif medikal tedavi ile dekompresif hemikraniektomidir. Seçeneklerden dekompresif kraniektomi sadece mortaliteyi azaltmakla etki etmemekte aynı zamanda uzun süreçte morbiditeyi anlamlı şekilde azaltmakta ve muhtemelen kan beyin bariyeri üzerindeki hasarı azaltarak hem de leptomeningeal kollateral üzerinden serebral perfüzyon basıncını artırarak iskemik infarkt alanını azaltmaktadır. (17) Bu tedavi seçeneği masif serebral iskemik inme hastalarında çalışmalarda etkinliği değerlendirilmiş olsa da optimal tedavi penceresi hakkında halen tartışmalar devam etmektedir. (15,16,17)

Masif iskemik inme hastalarında , dekompresif kraniektomi tedavi seçeneğinin zamanlaması ve etkinliği üzerine değerlendirilen önemli 5 randomize klinik çalışma yapılmıştır. (15) Avrupa ülkeleri tarafından dizayn edilen 3 randomize klinik çalışmanın [**HAMLET** (Hemicraniectomy After Middle cerebral artery infarction with Life-threatening Edema Trial) , **DESTINY** (Decompressive Surgery for the treatment of malignant infarction of the middle cerebral artery), **DECIMAL** (**DE**compressive **C**raniectomy **In MAL**ignant middle cerebral

artery)] ve bu çalışmalarının sonuçların havuzlanıp metaanaliz edildiği 2 çalışma sonucu yayınlanmıştır. Fakat Kuzey Amerika **HeADDFIRST** (**Hemicraniectomy And Durotomy on Deterioration From Infarction Related Swelling Trial**) çalışması tamamlanmış sonuçlarının yayınlanması beklenirken , Filipin **HeMMI** (**Hemicraniectomy for Malignant Middle cerebral artery Infarcts**) çalışması da halen hasta kabulü yapmaktadır. (15) Bu üç büyük randomize klinik çalışmaya katılan hastalar intrakranial basınç artışı semptomları başlamasından ilk 48 saat içerisinde çalışmaya dahil edilip dekompresif cerrahi uygulanmıştır ve 1 yıl sonraki fonksiyonel bağımsızlık ve morbidite değerlendirilmesi yapılmıştır. (15) 3 büyük klinik çalışmada da konservatif olarak tedavi edilen hasta grubuna göre dekompresif cerrahi grubunda mortalitede anlamlı azalma saptanmıştır. (15) (Tablo-5.1’de çalışmaların özet verileri bulunmaktadır.) Bu klinik çalışma sonuçlarını ve patofizyolojik süreci birlikte değerlendirdiğimizde masif iskemik inme hastalarında intrakranial basınç artışı semptomlarının başlamasından sonraki ilk 48 saat içerisinde erken dekompresif cerrahinin gerçekleştirilmesinin faydalı olabileceği öngörülmektedir.

Çalışma ismi	Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	Primer Outcome Belirteçleri	Mortalite ve Outcome (Hemikraniyektomi/ Konservatif Tedavi)			
			Hasta Sayısı	Ort. Yaş(yıl)	Mortalite, %	İyi out-come ,%
DECIMAL	18-55 yaş arası,semptomlar başladıktan sonra ilk 24 saat	mRS<4, 6.ay	20 /18	43.5 /43.4	25/77.8	50 /22.2
DESTINY	18-60 yaş arası,semptomlar başladıktan sonra ilk 12-36 saat	mRS<4, 6.ay	17 /15	43.2 /53.3	17.6/53	47.1 /26.7
HAMLET	18-55 yaş arası,semptomlar başladıktan sonra ilk 96 saat	mRS<4, 12.ay	32 /32	50 /47.4	22/59	25 /25
HeADDFIRST	Semptomlar başladıktan sonra ilk 96 saat,klinik-radyolojik kötüleşme	Ölüm,fonksiyonel outcome,hayat kalitesi,Taburculuk sonrası acile başvuru 21.-90.-180.günler	26	Yayınlanması beklenmektedir.		
HeMMI	Semptomlar başladıktan sonra ilk 72 saat, klinik kötüleşme	Taburculukta,2.haftada ve 3.-6.ayda mRS ve Barthel Index	Veri toplaması devam etmektedir.			

TABLO-5.1: Dekompresif Hemikraniyektomi Çalışma Verileri Özeti

(Staykov ve Gupta :Hemicraniectomy in malignant middle cerebral artery infarction, Stroke 2011; 42:513-5 (15))

Hayvan deneysel çalışmalarında ; dekompresif cerrahinin mortaliteyi azalttığı ve histolojik ve fonksiyonel bağımsızlığı iyileştirdiği gösterilmiştir. (17,32) Literatürdeki diğer çalışma örnekleri incelendiğinde erken dekompresyon saati 4.saate ve geç dekompresyon saati 24.saate olarak alınmıştır. (17, 33, 34 ,35) A. Doerfler ve arkadaşlarının ratlarda endovasküler yöntemle geçici orta serebral arter okluzyonu modeli oluşturarak incelediği serebral iskemi-reperfüzyon modelinde 4. ve 24. saate dekompresif kraniyektomi yapılarak sıçanların beyinlerinin 4.-24.-48.-72. ve 168. saatte difüzyon ve perfüzyon magnetik rezonans görüntülemeleri alınmıştır. Erken dekompresif cerrahi uygulanan deney grubunda kortikal perfüzyonun iyileştiği, infarkt volumunun küçük olduğu ve nörolojik performansta daha iyi skorların elde edildiği gösterilmiştir. (35) T.Engelhorn ve arkadaşlarının benzer yaptığı çalışmada 4. saate yapılan dekompresif cerrahi grubunda nörolojik performansta iyileşme ,kilo kaybı ve infarkt volumunda azalma saptanmıştır. (36) T. Engelhorn ve arkadaşlarının diğer çalışmasında sıçanlarda serebral iskemi ve reperfüzyon modeli olarak endovasküler yöntemle otolog fibrin-zengin pıhtı embolizasyonu ile serebral iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulmuş . Fakat küçük tromboembolik orta serebral arter infarktlarında dekompresif kraniyektominin yararlı olamayacağı gösterilmiştir. (34).

Çalışmamızda erken dekompresif kraniyektomi yapılan grubunda istatistiksel olarak anlamlı infarkt volumunda anlamlı azalma mevcuttu. (p=.014)

Hayvan deneysel çalışmalarında KBB geçirgenliği artışı matrix metalloproteinaz (MMP)-9 ve MMP-2 enzimlerinin artmış aktivitesi ve ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir.(37,38) Aynı zamanda MMP-9'un KBB geçirgenliği modülasyonu üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir. (22) Ek olarak iskemik inme sonrası klinik insan bazlı çalışmalarda MMP-9 aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. (40) .Devam eden çalışmalarda MMP-9 proteinin KBB geçirgenliğini module etmesini KBB komponentleri olan sıkı

bağlantı proteinleri occludin ve claudin-5 ile basal lamina proteinleri fibronectin ,laminin ve heparan sulfat degradasyonu yolu ile yaptığı kanıtlanmıştır. (28,41)

KBB geçirgenliği değişimi akut iskemik inme hastalarında semptomların başlamasında 12 saat içinde kranial BT (Bilgisayarlı Tomografi) perfüzyon görüntülemesi ile değerlendirilmiştir. (42,43) Deney hayvanlarında yapılan serebral iskemi modelinde KBB hasarı ; iskeminin kalıcı veya geçici oluşu ile serebral kan akımı miktarına göre değişmektedir. (42) İskemi –reperfüzyon hasarı oluşturulan modellerde farelerde KBB geçirgenliği artışı ilk 1 saatte ve sıçanlarda ilk 3-5 saatte gözlenmektedir. (43,44,45) Fakat kısa süreli KBB geçirgenliği azalması sonrası 6-24 saat sonra meydana gelen ve yayınlarda 4-5 haftaya kadar uzadığı belirtilen ikinci KBB geçirgenliği artışı meydana gelmektedir. Bu durum literatürde (açık-kapalı-açık) bifazik KBB kaçağı olarak tanımlanmaktadır. (44,46,47) . Özellikle ikinci uzun süreli KBB geçirgenliği artışı postiskemik hasar derecesinde rol oynamaktadır. (48) Masif serebral ödem , iskemi sonrası hastalarda ciddi serebral ödem gelişimi ilk 2. ve 5.gün arasında olmaktadır. (49) Deneysel çalışmalarda ratlarda bu sürenin ilk 24-48 saatlerinde serebral ödem maksimum olmaktadır.(35,36,50) Fakat literatürde masif iskemik vakalarında dekompresif kraniektominin etkinliğini KBB üzerindeki moleküler değişiklikler üzerinden gösteren henüz yayınlanan deneysel çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda occludin ve claudin-5 ,erken dekompresif kraniektomi yapılan grupta ; geç dekompresif kraniektomi yapılan grupla karşılaştırıldığında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterildi. (occludin için $p=.013$; claudin-5 için $p=.034$)

Deneysel çalışmalarda büyük ve küçük molekul ağırlıklı (HMW-High Molecular Weight /LMW-Low Molecular Weight) maddelerin kimyasal geçişini değerlendirmek amacıyla sırasıyla periferik verilen Evans Blue (EB, 961 Da) ve Sodyum Floresans (NaF, 376 Da) boyaması sıklıkla kullanılmaktadır. (62,64)

Evans Blue (EB) , serum albumin (69.000 Da) sıkıca bağlanarak büyük molekül ağırlıklı madde halinde dolaşımda bulunmakta ve HMW maddelerin KBB geçişini temsil etmekte ,KBB'ni endotel hücreler arasındaki pinositik vezikullerden geçmektedir. Buna karşın Sodyum Floresans (NaF) albumin ile bağlanmamakta serbest olarak dolaşımda bulunmakta ; bundan dolayı LMW maddelerin KBB geçişini temsil etmekte ve interendotelyal yarıklardan paraselüler olarak KBB'ni aşmaktadır. (62) Bu özellikleri ile iki boyama yöntemi de KBB'den hem HMW hem de LMW madde geçişini göstermesi yönünden önemlidir. Yapılan çalışmalarda KBB'den geçen NaF boya seviyeleri post-iskemi sonrası 24-48 saat arasında progresif artmakta ; buna karşın KBB'den geçen EB boya seviyeleri bu zaman diliminde değişmemektedir. Bu iki boya arasında farklılığın iskemi sonrası KBB'de paraselüler geçirgenliğin progresif artışına bağlı olabileceği öne sürülmüştür. (62)

Çalışmamızda NaF ve EB KBB geçirgenliği arasında dekompresif kraniektomi sonrası istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır. (EB için $p=.274$; NaF için $p=.284$)

Serebral ödem malign infarktlarda kötü prognoz ile ilişkili major durumlardandır. Serebral ödem deneysel hayvan modellerinde seçilen iskemik model,iskemi süresi ve serebral ödem metoduna bağlı olarak değişmektedir. (51,52) Ratlar iskemi sonrası 24-48 saat içerisinde ipsilateral serebral ödem ve geniş hemisferik infarkt nedeni herniasyon sonucu ölmektedir. (51,53) Deneysel hayvan modellerinde ,serebral ödem hesaplaması yaş-kuru beyin ağırlığı farkı ile ortaya çıkan beyin su içeriği ile değerlendirilmektedir.(54) İntrakranial basınç formülüne göre serebral şişme Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) ve kan yer değişimi ile birlikte olur. BOS beyin volumunun yaklaşık %15i kadardır. Yapılan çalışmalarda beyin su içeriğinin %77'den %80'e artması %15 oranında beyin şişmesine yol açmakta ve bu durum olası BOS değişimi ile gerçekleşmektedir. (54,55) *Gerriets* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada permanent MCAO sonrası 24 . saatte aynı ratlara hem % beyin su içeriği (yaş – kuru beyin ağırlık farkı) ve hemisferik şişme (MRI-Magnetic Resonance Imaging-görüntüleme) serebral ödem değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonuçlarda % beyin su içeriği farkı %4.19 iken MRI ile hesaplanan değer %18.34 olarak

hesaplanmıştır. Bu sonuçlarla % beyin su içeriği formula ile serebral ödem hesaplamasında daha büyük farkların gözden kaçabileceği gösterilmiştir.(54,56)

Çalışmamızda erken ve geç dekompresif kraniektomi yapılan grupların karşılaştırılmasında beyin su hacmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. ($p=.178$)

Çalışmamızda erken dekompresif kraniektomi yapılan grupta infarkt volum azalması anlamlı olarak saptanırken serebral ödem açısından anlamlı değerler elde edilememesi nedeni birincil olarak 28.saatte sakrifasyon yapıldığı için rat beyinlerinde ciddi ödem gelişmesi gerçekleşmeden erken süreçte işlem sonlandırılmış olabilir. İkincil olarak daha önceki çalışmanın gösterdiği üzere MRI gibi görüntüleme metoduyla serebral ödem hesaplaması yapılması ile daha büyük farklar elde edilebilirdi ve anlamlı fark ortaya çıkabilirdi.

VI. SONUÇ:

Bu bulgular erken dönemde yapılan dekompresif kraniektominin hem infarkt volumunu azalttığı hem de kan beyin bariyeri yıkımını azaltarak nöroprotektif etkisinin gösterilmesi açısından önemlidir.

VII. REFERANSLAR:

1- Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, Khatri P, McMullan PW Jr, Qureshi AI, Rosenfield K, Scott PA, Summers DR, Wang DZ, Wintermark M, Yonas H. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association .Stroke., 2013; 44(3):870-947

2- Ginsberg MD ve Raul BS. Rodent Models of Cerebral Ischemia . Stroke.1989; 20:1627-1642

3-Marco B, Giancarlo C ve Dirk MH. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia.The Open Neurology Journal. 2010; 4, 34-38

4-Marco B, Giancarlo C ve Dirk MH. Animal Models of Ischemic Stroke. Part One: Modeling Risk Factors. The Open Neurology Journal. 2010; 4, 26-33

5-Wang-Fischer. Y. Manual of stroke models in rats, CRC Press, Taylor &Francis Group, 2009.

6- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson ve R. Cummins .Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989 ; Vol 20; 84-91.

7- Casals JB, Pieri NC, Feitosa ML, Ercolin AC, Roballo KC, Barreto RS, Bressan FF, Martins DS, Miglino MA, Ambrósio CE. The Use of Animal Models for Stroke Research: A Review. Comp. Med. 2011; Vol 61, No 4:305–313

8-Heather SO, Peter C ve Eckard W.Rat Strain and Vendor Differences In Collateral Anastomoses Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1997; 17:571-576

- 9- Coyle P ve Jokelainen PT . Dorsal Cerebral Arterial Collaterals of the Rat .The Anatomical Record .1982; 203:397-404
- 10- Busch HJ, Buschmann IR, Mies G, Bode C, Hossmann KA. Arteriogenesis in Hypoperfused Rat Brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.2003;23: 621–628
- 11- Richard J. Traystman. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia.ILAR Journal 2003; 44-2:85-95
- 12-Wolfgang Walz. Rodent Models of Stroke. Canada, Springer 2010
- 13- Hofmeijer J,Amelink GJ, Algra A, van Gijn J, Macleod MR, Kappelle LJ, van der Worp HB ve HAMLET araştırmacıları.. Hemicraniectomy after middle cerebral artery infarction with life-threatening Edema Trial (HAMLET) . Trials Journal.2006 ;7:29
- 14- Jüttler E, Schwab S, Schmiedek P, Unterberg A, Hennerici M, Woitzik J, Witte S, Jenetzky E, Hacke W. Decompressive Surgery for the treatment of malignant infarction of the middle cerebral artery (DESTINY) . Stroke 2007; 38:2518-2525
- 15-Staykov ve Gupta :Hemicraniectomy in malignant middle cerebral artery infarction. Stroke 2011; 42:513-516
- 16- Arnaout OM, Aoun SG, Batjer HH, Bendok BR. Decompressive hemicraniectomy after malignant middle cerebral artery infarction: rationale and contreversies . Neurosurg Focus 2011; 30 (6) :E18
- 17- Forsting M, Reith W, Schäbitz WR, Heiland S, von Kummer R, Hacke W, Sartor K.Decompressive craniectomy for cerebral infarction. An experimental study in rat. Stroke 1995; 26:259-264

18- Hofmeijer J, Van der Worp HB, Kappelle LJ. Treatment of space occupying cerebral infarction. *Crit Care Med* 2003; 31:617-625.

19- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* .1999; 22: 391–397.

20- Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* .2004; 24: 133–150. doi:10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04.

21- Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Frisina-Deyo A, et al. Blood-Brain Barrier Alterations Provide Evidence of Subacute Diaschisis in an Ischemic Stroke Rat Model. *PLoS ONE*.2013; 8(5): e63553. doi:10.1371/journal.pone.0063553

22- Yang F, Zhang X, Sun Y, Wang B, Zhou C, Luo Y, Ge P. Ischemic Postconditioning Decreases Cerebral Edema and Brain Blood Barrier Disruption Caused by Relief of Carotid Stenosis in a Rat Model of Cerebral Hypoperfusion. *PLoS ONE*.2013; 8(2): e57869.

23-Dong X, Song YN, Liu WG, Guo XL. MMP-9, a potential target for cerebral ischemic treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7:269–275.

24- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation .*Fluids and Barriers of the CNS*. 2012; 9:23

25- Wei-Ye Liu, Zhi-Bin Wang, Li-Chao Zhang,Xin Wei ve Ling Li. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18. 2012; 609–615

26- Hartwig Wolburg, Andrea Lippoldt. Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* 38. 2002;323– 337

27-Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*.2010;37;13-25

28- Panickar KS, Anderson RA. Effect of polyphenols on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuronal death and brain edema in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*.2011; 12:8181–8207.

29- Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A ve Cowled PA. Upregulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* .2002; 23:260–269

30- Sandritter W ve Jesteadt R . Triphenyltetrazolium chloride (TTC) alreduktionsindikator zur makroskopischen diagnoses des frischen herzinfarktes. *Verh Dsch Ges Pathol* 1958; 41(165).

31- Lovisa Holm. Focal ischemic reperfusion stroke model in rats and the role of galanin. *Linköping University Medical Dissertations*: No. 1242. 2011.

32- Doerfler A, Forsting M, Reith W, Staff C, Heiland S, Schabitz WR, von Kummer R, Hacke W, Sartor K. Decompressive craniectomy in a rat model of "malignant" cerebral hemispheric stroke: experimental support for an aggressive therapeutic approach. *J Neurosurg*. 1996; 85:853-859.

33- Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M. Combination of decompressive craniectomy and mild hypothermia ameliorates infarction volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke* .2001; 32:2675-2681

34- Engelhorn T, von Kummer R., Reith W, Forsting M ve Doerfler A. What Is Effective in Malignant Middle Cerebral Artery Infarction: Reperfusion, Craniectomy, or Both?: An Experimental Study in Rats: *Stroke*. 2002;33:617-622.

35- Doerfler A, Engelhorn T, Heiland S, Benner T , Forsting M. Perfusion and diffusion weight magnetic resonance imaging for monitoring decompressive craniectomy in animals with experimental hemispheric stroke. J Neurosurg. 2002 May; 96 (5) 933-40

36- Engelhorn T, Doerfler A, Egelhof T, Schwab S, Heiland S, Sartor K, Forsting M. Follow up monitoring with magnetic resonance tomography after decompressive trephining in experimental malignant hemispheric infarct . Zentralbl Neurochir. 1998; 59 (3) :157-65

37- Lok J, Zhao S, Leung W, SeoJH, Navaratna D, Wang X, Whalen MJ, Lo EH. Neuregulin-1 effects on endothelial and blood-brain-barrier permeability after experimental injury. Transl Stroke Res .2012; 3(S1):S119–S124.

38- Lee H, Park JW, Kim SP, Lo EH, Lee SR. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. Neurobiol Dis.2009; 34:189–198.

39- Yang F, Zhang X, Sun Y, Wang B, Zhou C, Luo Y, Ge P. Ischemic Postconditioning Decreases Cerebral Edema and Brain Blood Barrier Disruption Caused by Relief of Carotid Stenosis in a Rat Model of Cerebral Hypoperfusion. PLoS ONE. 2013;8(2): e57869.

40-Switzer JA, Hess DC, Ergul A, Waller JL, Machado LS ,Portik-Dobos V, Pettigrew LC, Clark WM, Fagan SC. Metalloproteinase-9 in an Exploratory Trial of Intravenous Minocycline for Acute Ischemic Stroke. Stroke.2011; 42: 2633–2635.

41-Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab.2007; 27: 697–709

42-Garbuzova-Davis S, Rodrigues MCO, Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Frisina-Deyo A, Boffeli SM, Abraham JV, Pabon M, Wagner A, Ishikawa H, Shinozuka K, Haller E, Sanberg PR, Kaneko Y, Borlongan CV. Blood-Brain Barrier Alterations Provide Evidence of Subacute Diaschisis in an Ischemic Stroke Rat Model. PLoS ONE.2013; 8(5): e63553.

43-Dankbaar JW, Hom J, Schneider T, Cheng S-C, Bredno J, van der Schaaf IC, Wintermark M. Dynamic perfusion-CT assessment of early changes in blood brain barrier permeability of acute ischaemic stroke patients. J Neuroradiol .2011; 38: 161–166.

44-Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Res.1996; 739: 88–96.

45-Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla H-J, Steinmetz H, ve ark . NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. Stroke.2007; 38: 3000–3006. doi:10.1161/STROKEAHA.107.489765.

46- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE . Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. Stroke.1998; 29: 2189–2195.

47- Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I . The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. Acta Neuropathol.1985; 68: 122–129.

48- Abo-Ramadan U, Durukan A, Pitkonen M, Marinkovic I, Tatlisumak E, Pedrono E, Soinne L, Strbian D, Tatlisumak T. Post-ischemic leakiness of the blood-brain barrier: a quantitative and systematic assessment by Patlak plots. Exp Neurol.2009; 219: 328–333.

49- Wardlaw JM, Dennis MS, Lindley RI, Warlow CP, Sandercock PAG, Sellar R. Does early reperfusion of a cerebral infarct influence cerebral infarct

swelling in the acute stage or the final clinical outcome? Cerebrovasc Dis. 1993; 3:86-93.

50-Engelhorn T, Doerfler A, Kastrup A, Beaulieu C, de Crespigny A, Forsting M, Moseley ME, Faraci FM. Decompressive craniectomy ,reperfusion or a combiantion for early treatment of acute malignant cerebral hemispheric stroke in rats ? : Potential mechanisms studied by MRI. Stroke .1999; 30 :1456-1463

51- Karsten Overgaard, Rune S Rasmussen, Flemming F Johansen.The site of embolization related to infarct size, oedema and clinical outcome in a rat stroke model - further translational stroke research Experimental & Translational Stroke Medicine. 2010; 2:17

52-Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Chang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. Am J Pathol. 1993; 142:623-635.

53-DeGirolami U, Crowell RM, Marcoux FW. Selective necrosis and total necrosis in focal cerebral ischemia. Neuropathologic observations on experimental middle cerebral artery occlusion in the Macaque monkey. J Neuropathol Exp Neurol.1984; 43:57-71

54- Richard F Keep, Ya Hua1,ve Guohua Xi.Brain water content. A misunderstood measurement?. Transl Stroke Res . 2012 ; 3(2): 263–265.

55-Wagner KR, Xi G, Hua Y, Kleinholz M, de Courten-Myers GM, Myers RE, Broderick JP, Brott TG. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematoma white matter. Stroke. 1996; 27(3):490–7.

56-Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. Stroke. 2004; 35(2):566–71.

- 57- Engelhorn T, Heiland S, Schabitz WR, Schwab S, Busch E, Forsting M, Doerfler A. Decompressive craniectomy in acute cerebral ischemia in rats. Is there any benefit in smaller thromboembolic infarct. *Neurosci Lett*. 2004 Nov 11; 370 (2-3) :85-90.
- 58- Koizumi J, Yoshida Y, Nakagawa Y, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986; 8: 1-8.
- 59- Bederson, J. B., L. H. Pitts, M. Tsuji, M. C. Nishimura, R. L. Davis ve H. Bartkowski. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(3): 472-476.
- 60- Adachi M, Feigin I. Cerebral oedema and the water content of normal white matter. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1966; 29(5):446–50.
- 61- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM . Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17:1304–1308
- 62- Lenzser G, Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Sándor P, Komjáti K, Szabó C, Busija DW. Contribution of poly(ADP-ribose) polymerase to postischemic blood–brain barrier damage in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* .2007;27, 1318–1326
- 63- Krieger Derk W, Demchuk Andrew M Kasner Scott E, Jauss M, Hantson L. Early Clinical and Radiological Predictors of Fatal Brain Swelling in Ischemic Stroke. *Stroke*. 1999;30:287-292.
- 64- Lola Fenghuei Yen , Vivi Chiali Wei, Eva Yuhua Kuo , Ted Weita Lai. Distinct Patterns of Cerebral Extravasation by Evans Blue and Sodium

Fluorescein in Rats. PLoS ONE. 2013; 8(7): e68595.

doi:10.1371/journal.pone.0068595

65- Goldstein LB, Bushnell CD, Adams RJ, Appel LJ, Braun LT, Chaturvedi S, Creager MA, Culebras A, Eckel RH, Hart RG, Hinchey JA, Howard VJ, Jauch EC, Levine SR, Meschia JF, Moore WS, Nixon JV, Pearson TA. Guidelines for the Primary Prevention of Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;42(2):517-84.

66-Menzies SA, Hoff JT, Betz LA. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*. 1992;31:100–107.