



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ SONRASI
URAPİDİL VE RESVERATROL KOMBİNE TEDAVİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. RIDVAN ÇETİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR-2022



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL SEREBRAL İSKEMİ SONRASI
URAPİDİL VE RESVERATROL KOMBİNE TEDAVİNİN
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. RIDVAN ÇETİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. YAHYA TURAN

DİYARBAKIR-2022

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerini bizden esirgemeyen bize sadece hocalık yapmayıp aynı zamanda bizi hayata hazırlayan sayın Prof. Dr. Adnan CEVİZ ve sayın Prof. Dr. Tevfik YILMAZ hocalarıma bana kattıkları herşey için teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç.Dr. Yahya TURAN 'a teşekkürü borç bilirim.

Beraber çalıştığım bilgi, hoşgörü ve sabrını benden esirgemeyen hocalarım Doç.Dr. Hüseyin ÖZEVREN'e ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim BAŞAR'a;

Birlikte çalışmaktan büyük keyif adığım, sadece asistanlık sürecinde değil hayatımın her alanında desteğini arkamda hissettiğim değerli Op. Dr. Kamuran AYDIN'a ve Op. Dr. Barış ASLANOĞLU' na;

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve aynı ekipte olmaktan gurur duyduğum Dr. Burak ATLAS, Dr. Mehmet Salih ATAMA, Dr. Aziz ÇEVİK, Dr. Abdullah YİĞİT, Dr. Barış ALTUN, Dr. Muhammed Mazlum KILIÇ, Dr. İsmail Behçet BAZ, bütün hemşire ve personellere;

Tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, histolojik incelemesini değerli zamanını ayırarak yapan ve ilgi ve özverisini esirgemeyen Dr. Uğur ŞEKER'e;

Bugünlere gelmemi sağlayan ve maddi manevi her zaman yanımda olan değerli anneme, babama ve kardeşlerime;

Uzun ve yorucu asistanlık eğitimim boyunca ve hayatın her alanında desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sevgi ÇETİN'e, hayatımıza girişiyle renk katan canım oğlum Muhammed Gürkan'a tüm kalbimle teşekkür ederim. Sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr.Rıdvan ÇETİN

DIYARBAKIR, 2022

ÖZET

Ratlarda deneysel serebral iskemi sonrası urapidil ve resveratrol kombine tedavinin nöroprotektif etkilerinin araştırılması

Rıdvan ÇETİN, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

Giriş ve Amaç: Serebral iskemi, beynin kan akışının azalmasına sekonder olarak nöral dokular için gerekli olan oksijenasyonun sürdürülememesidir. Morbitide ve mortalitenin en önemli nedenleri arasında iskemik inme yer alır. İnme; hemorajik inme ve iskemik inme olarak ikiye ayrılır. Yaklaşık olarak inmelerin %88'ini iskemik inme oluşturur. İskemik inmelerin çoğunluğunu MCA'dan beslenen alanlarda görülür. İskemik inmede günümüzde 2 tedavi yaklaşımı öne çıkmaktadır. Bunlar rekanalizasyon ve nöroproteksiyondur. Rekanalizasyonda kabul edilen tek medikal tedavi seçeneği rtPA'dır. rtPA'nın iskemik inmede ilk 4,5 saatte kullanılabilmesi sebebiyle kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle kullanımı daha geniş olabilen tedaviler üzerinde çalışılmaktadır.

İskemik inmede bir dizi karmaşık mekanizma rol oynamaktadır. Nöroproteksiyon, bu biyokimyasal ve moleküler olayların engellenip veya yavaşlatılmasıyla ilgili beyni iskemiye karşı koruma gayretidir. Bu amaca uygun birçok antioksidan, antiapoptotik, antioksidotoksikite ve antiinflamatuvar ajanlar kullanılmıştır.

Başlıca üzümde ve yer fıstığında bulunan resveratrol antikanserojenik, antiinflamatuvar, nöroprotektif ve kardioprotektif gibi birçok etkisi olan bir fitoaleksindir.

Sempatolitik bir antihipertansif ilaç olan Urapidil yapılan çalışmalarda vazodilatör etkisiyle iskemik olgularda reperfüzyon öncesinde uygulandığında protektif bir ajan olarak kullanılabileceğine yönelik bulgular, ayrıca iskemi durumunda urapidil tedavisinin hücresel boyutta antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik aktivite göstererek koruyucu olduğuna dair bulgular bulunmasına

karşın henüz serebral iskemide çalışılmamış bir vazodilatatördür. Biz de bu iki ilacın kombinasyonunun serebral iskemi sonrası etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 35 adet rastgele seçilmiş $328,53 \pm 47,20$ gr ağırlıkları olan 35 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. 10 mg/kg ksilazin ve 80 mg/kg ketamin ile anestezi uygulandıktan sonra sağ external karotid arterden girerek internal karotid artere doğru yönlendirilen suture internal karotid arterden ilerletilerek MCA oklüzyonu sağlandı. 2 saat bekletip iskemi oluşturulduktan sonra suture geri çekilip reperfüzyon sağlandı. Sıçanlar 7'li 5 gruba ayrıldı. 1. grup herhangi bir işlem yapılmayan grup, 2. grup iskemi oluşturulan grup, 3. grup iskemi sonrası urapidil verilen grup, 4. grup iskemi sonrası resveratrol verilen grup ve 5. grup iskemi sonrası urapidil + resveratrol kombine verilen grup olarak ayrıldı. Resveratrol(i.p.) 30 mg/kg/gün, urapidil(i.p.) ise 5 mg/kg/gün dozunda 3 gün verildi. Tedaviden sonra tekrardan anestezi uygulanan sıçanlar önce torakotomi ile intrakardiyak kanları alındı. Sıçanlar sakrifiye edilip beyin dokuları steril şartlarda çıkarıldı. Çıkarılan dokular oda sıcaklığında %10'luk formaldehit içerisinde fikse edildi.

Elde edilen kesitler hemtatoxilen & eosin ile boyandı. Kesitlerde konjesyon, perinöral ve perivasküler ödem, hücre çekirdeklerinde piknozis ve reperfüzyon sonrası kanama odakları değerlendirildi. Alınan kesitler ayrıca parafin bloklarına gömülerek üzerlerine Bcl-2, TNF- α ve kaspaz-3 antikorları damlatılıp oluşan sinyaller gözlemlendi.

Bulgular: Deneyimizde beyin dokusunda hemorajik alanlar, perinöral ödem, vasküler yataklarda konjesyon, nöron ve glial hücre çekirdeklerinde piknozis, kaspaz-3, Bcl-2 ve TNF- α ekspresyonları incelendi. İskemi grubunda diffüz ve fokal ve hemorajik alanlar, nöron ve glialarda piknotik çekirdek miktarında artış, vasküler lümende konjesyon, perinöral ödem, kaspaz-3 düzeyinde artış, Bcl-2 immunpozitivitesinde azalma ve TNF- α düzeyinde artış saptandı. İskemiden sonra urapidil verilen grupta hemoraji alanlarının kaybolduğu, nöron ve glial hücrelerde piknotik çekirdekli hücrelerin oldukça azaldığı, perinöral ödemin oldukça azaldığı, kaspaz-3 ve Bcl-2 immunpozitivitesi azalıp, TNF- α ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. İskemiden sonra resveratrol verilen grupta hemoraji alanlarının önemli oranda

azaldığı, perinöral ödem ve nöron ve glial hücrelerde piknozis görülse de iskemi grubuna kıyasla bu oranın oldukça azaldığı görüldü. Kaspaz-3 immunopozitivitesi kontrol grubuna benzerlik gösterirken, Bcl-2 ve TNF- α ekspresyonunda azalma izlendi. İskemi sonrası urapidil ve resveratrol kombine tedavi verilen grupta ise subaraknoid kanama izlerinin neredeyse tamamen ortadan kalktığı, beyin dokusuna geçen kan doku hücrelerinin büyük oranda ortadan kalktığı görüldü, perinöral ödemin kaybolduğu, nöron ve glial hücrelerde piknotik çekirdekli hücrelerin azaldığı izlendi. Kombine tedavi verilen grupta kaspaz-3 düzeyinin kontrol grubuna çok yakın olduğu, özellikle ödemli ve hemorajik beyin doku alanlarında Bcl-2 ekspresyonunda kısmen artış olduğu; TNF- α düzeyinin ise çok düşük eksprese edildiği görüldü.

Sonuç: İskemik inmede resveratrol ve urapidil kombine tedavisinin nöroprotektif olduğu, reperfüzyon sonrası kanamayı azalttığı ve apoptozu önlediği görülmüş, bu yüzden iskemik inme tedavi protokollerinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Urapidil, Resveratrol, Nöroprotektif, Apoptoz

ABSTRACT

Investigation of neuroprotective effects of urapidil and resveratrol combined treatment after experimental cerebral ischemia in rats.

Rıdvan ÇETİN, Dicle University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Diyarbakır

Introduction and Aim: Cerebral ischemia is the inability to maintain the oxygenation required for neural tissues secondary to decreased blood flow to the brain. Ischemic stroke is among the most important causes of morbidity and mortality. Stroke is divided into hemorrhagic stroke and ischemic stroke. Ischemic stroke accounts for approximately 88% of strokes. The majority of ischemic strokes occur in areas fed by MCA. Currently, two treatment approaches stand out in ischemic stroke. These are recanalization and neuroprotection. The only accepted medical treatment option in recanalization is rtPA. Since rtPA can be used in the first 4.5 hours in ischemic stroke, its usage is limited. Therefore, treatments that may be used more broadly are being studied.

A number of complex mechanisms play a role in ischemic stroke. Neuroprotection is the effort to protect the brain against ischemia by inhibiting or slowing down these biochemical and molecular events. Many antioxidant, antiapoptotic, antiexcitotoxic and anti-inflammatory agents have been used for this purpose.

Resveratrol, which is mainly found in grapes and peanuts; is a phytoalexin with many effects such as anticarcinogenic, anti-inflammatory, neuroprotective and cardioprotective.

Urapidil, a sympatholytic antihypertensive drug, is a vasodilator, although there are findings in the studies that it can be used as a protective agent when applied before reperfusion in ischemic cases with its vasodilator effect, and there are also findings that urapidil treatment in ischemia is protective by showing antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic activities at the cellular level has not yet been studied in cerebral ischemia,. We also investigated the effects of the combination of these two drugs after cerebral ischemia.

Materials and Methods: In our study, 35 randomly selected female Sprague Dawley rats with a weight of 328.53 ± 47.20 gr were used. After anesthetization with 10 mg/kg xylazine and 80 mg/kg ketamine, the suture which was directed towards the internal carotid artery by entering from the right external carotid artery was advanced through the internal carotid artery and MCA occlusion was achieved. After waiting for 2 hours, ischemia was created, the suture was withdrawn and reperfusion was provided. The rats were divided into 5 groups of 7. The first group was the group that did not undergo any procedure, the second group was the ischemia-induced group, the third group was given urapidil after ischemia, the fourth group given resveratrol after ischemia, and the fifth group was given urapidil + resveratrol combined after ischemia. Resveratrol (i.p.) was given at a dose of 30 mg/kg/day and urapidil (i.p.) was given at a dose of 5 mg/kg/day for 3 days. After the treatment, the rats were re-anesthetized and their intracardiac blood was taken by thoracotomy. The rats were sacrificed and their brain tissues were removed under sterile conditions. The excised tissues were fixed in 10% formaldehyde at room temperature.

The obtained sections were stained with hematoxylin & eosin. Congestion, perineural and perivascular edema, pycnosis in the cell nuclei, and bleeding foci after reperfusion were evaluated in the sections. The sections taken were also embedded in paraffin blocks, and the signals formed by dropping Bcl-2, TNF- α and caspase-3 antibodies on them were observed.

Results: In our experiment, hemorrhagic areas in brain tissue, perineural edema, congestion in vascular beds, pycnosis in neuron and glial cell nuclei, caspase-3, Bcl-2 and TNF- α expressions were examined. In the ischemia group, diffuse and focal and hemorrhagic areas, an increase in the amount of pycnotic nuclei in neurons and glia, congestion in the vascular lumen, perineural edema, an increase in caspase-3 levels, a decrease in Bcl-2 immunopositivity and an increase in TNF- α levels were detected. In the group given urapidil after ischemia, it was observed that hemorrhage areas disappeared, pycnotic nucleated cells in neuron and glial cells were considerably reduced, perineural edema was considerably reduced, caspase-3 and Bcl-2 immunopositivity decreased, and TNF- α expression increased. After ischemia, it was observed that the hemorrhage areas were significantly reduced in the group

given resveratrol, and although perineural edema and pycnosis were observed in the neurons and glial cells, this rate was considerably lower compared to the ischemia group. Caspase-3 immunopositivity was similar to the control group, while Bcl-2 and TNF- α expression were decreased. In the group given urapidil and resveratrol combined treatment after ischemia, it was observed that the traces of subarachnoid hemorrhage were almost completely eliminated, the blood tissue cells that transferred to the brain tissue were largely eliminated, the perineural edema disappeared, and the pycnotic nucleated cells in the neurons and glial cells were decreased. It was observed that the caspase-3 level was very close to the control group in the combined treatment group, Bcl-2 expression was partially increased, especially in the edematous and hemorrhagic brain tissue areas; also the TNF- α level was detected as very low.

Keywords: Ischemia, Urapidil, Resveratrol, Neuroprotective, Apoptosis

ŞEKİL, RESİM VE FİĞÜR LİSTESİ

Şekil 1. İnme sınıflaması	4
Şekil 2. Otoregülasyonun düzenlenmesi (33)	10
Şekil 3. Serebrovasküler kontrolün birçok mekanizmayla düzenlenmesi (33).....	12
Şekil 4. Resveratrol kimyasal yapısı.....	24
Resim 1. Çalışmamızda kullandığımız resveratrol.....	28
Resim 2. Çalışmamızda kullandığımız Urapidil.....	29
Resim 3. Alanın batikonla boyandıktan sonra izotonikle yıkanması ve steril yeşille örtülmesi. Transvers cilt insizyonu	30
Resim 4. Glandüler doku , sternohyoid kas ve sternomastoid kasın görüntüsü	31
Resim 5. beyaz ok: nervus vagus siyah ok: karotis kommunis.....	32
Resim 6. Karotis kommunis takip edilerek karotis externa ve intern ortaya konuldu.	33
Resim 7. Nervus vagus görüntüsü	34
Resim 8. External karotid arterin distalden sıkıca bağlanması.....	35
Resim 9. External karotid artterin bifurkasyona yakın yerden gevşek bağlanması.	36
Resim 10. Karotis kommunis ve karotis internanın klipslerle geçici olarak kapatılması	37
Resim 11. Arteriotomi yapılan external karotid arterden suturem ilerletilmesi	38
Resim 12. Karotis kommunis , karotis internanın görünümü; external karotidten suturen internal karotide doğru yönlendirilmesi	39
Resim 13. Tabakaların üsülüne uygun kapatılması	40
Resim 14. Rat beyninin yandan görüntüsü.....	42
Resim 15. Rat beyninin bazal görüntüsü	43
Figür 1: Kontrol grubu beyin korteksine ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.....	46
Figür 2: Kontrol grubu substansiya albaya ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.....	47
Figür 3: İskemi grubu beyin korteksine ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.	47
Figür 4: İskemi grubu substansiya albaya ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.	48
Figür 5: Resveratrol grubu beyin korteksine ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.	48
Figür 6: Resveratrol grubu substansiya albaya ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin... ..	49
Figür 7: Urapidil grubu beyin korteksine ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.	49
Figür 8: Urapidil grubu substansiya albaya ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.....	50
Figür 9: Resveratrol + Urapidil grubu beyin korteksine ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.....	50
Figür 10: Resveratrol + Urapidil grubu substansiya albaya ait kesit. Boyama: Hematoksilen & eozin.....	51
Figür 11: Kontrol grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Boyama: Kaspaz 3 immunohistokimya.	51
Figür 12: İskemi grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Boyama: Kaspaz 3 immunohistokimya.	52
Figür 13: Resveratrol grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Boyama: Kaspaz 3 immunohistokimya	52
Figür 14: Urapidil grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Boyama: Kaspaz 3 immunohistokimya.	53

Figür 15: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya.	
Boyama: Kaspaz 3 immunohistokimya.	53
Figür 16: Kontrol grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya.	
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya.	54
Figür 17: İskemi grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya.	
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya.	54
Figür 18: Resveratrol grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya.	
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya.	55
Figür 19: Urapidil grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya.	
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya.	55
Figür 20: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya.	
Boyama: Bcl-2 immunohistokimya.	56
Figür 21: Kontrol grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya.	
Boyama: TNF α immunohistokimya.	56
Figür 22: İskemi grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya.	
Boyama: TNF α immunohistokimya.	57
Figür 23: Resveratrol grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya.	
Boyama: TNF α immunohistokimya.	57
Figür 24: Urapidil grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya.	
Boyama: TNF α immunohistokimya.	58
Figür 25: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya.	
Boyama: TNF α immunohistokimya.	58

KISALTMA LİSTESİ

ATP: Adenozin trifosfat

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

NO: Nitrik oksit

cGMP: Siklik Guanozin monofosfat

MI: Miyokard enfarktüsü

TNF: Tümör nekroz faktörü

TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

CRP: C reaktif protein

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

TİA: Geçici iskemik atak

HT: Hipertansiyon

AHA: American Heart Association

ASA: American Stroke Association

CO: Karbonmonooksit

BT: Bilgisayarlı tomografi

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

DWI: Diffusion-weighted imaging

FLAIR: Fluid-attenuated inversion recovery

ADC: Apparent diffusion coefficient

PET: Pozitron emisyon tomografisi

SPECT: Single-photon emission computerized tomography

LGE- MRI: Late Gadolinium Enhancement - manyetik rezonans imagine

BNP: Brain natriuretic peptide

DMAH: Düşük molekül ağırlıklı heparin

SH: Standart heparin

IU: İnternational unit

İNR: İnternational normalized ratio

aPTT: Activated partial thromboplastin time

MCA: Middle cerebral arter

CMRO2: Cerebral metabolic rate of oxygen

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NMDA: N-metil-D-aspartat

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

KBB: Kan beyin bariyeri

MMP: Matrix metalloproteinaz

BAX: Bcl-2-associated X protein

BCL-2: B-cell lymphoma 2

SOD: Superoksid dismutaz

NOX: NADPH oksidaz

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

IGF-1: Insulin Like Growth Factor-1

CAM: Cell adhesion molecules

MCAo: MCA oklüzyon

KCL: Potasyum klorür

CPR: Cardiopulmonary resuscitatio

DMSO: Dimetil sülfoksit

JAK: Janus kinase

STAT: Signal transducer and activator of transcription

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	vi
ŞEKİL, RESİM VE FİĞÜR LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemik İnme	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. İnme sınıflaması.....	4
2.1.3. Risk faktörler	5
2.1.4. Radyolojik bulgular	6
2.1.5. İskemik inmenin tedavisi	7
2.2. Serebral Dolaşım ve Otoregülasyon	8
2.2.1. Otoregülasyon Mekanizmaları	9
2.2.2. Kan akışı - serebral metabolizma ilişkisi	10
2.2.3. Serebral kan akımının düzenlenmesi	11
2.2.4. Endotel	12
2.2.5. Astrositler.....	12
2.3. İskemik İnmede Patofizyoloji	13
2.3.1. Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği.....	13
2.3.2. İskemik çekirdek ve penumbra	14
2.3.3. Eksitotoksisite	14
2.3.4. Oksidatif stres	15
2.3.5. Kan Beyin Bariyer Bozukluğu	15
2.3.6. Mikrovasküler hasar.....	16
2.3.7. Hiperkoagülasyon ve trombosit aktivasyonu.....	16
2.3.8. İnflamasyon.....	17
2.3.9. Hücre ölümü.....	18
2.3.10. Reperfüzyon hasarı	19
2.4. Deneysel Serebral İskemi Modelleri.....	19
2.4.1. Fokal Serebral İskemik İnme Modelleri	20

2.4.2. Global Serebral İskemik İnme Modelleri.....	22
2.5. İlaçlar	23
2.5.1. Resveratrol	23
2.5.2. Urapidil	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deney Grupları.....	27
3.2. Anestezi.....	29
3.3. Cerrahi İşlem.....	29
3.4. Sakrifikasyon	41
4. MATERYAL VE METOT	44
4.1. Rutin Histolojik Takip	44
4.2. Hematoksilen ve Eozin boyama Protokolü.....	44
4.3. İmmunohistokimya Protokolü.....	45
5. BULGULAR.....	46
5.1. Histopatolojik Değerlendirmeler.....	46
5.1.1. Hematoksilen&Eosin Bulguları	46
5.1.2 İmmunohistokimyasal Bulgular	51
6. TARTIŞMA	59
7. SONUÇ	64
8. KAYNAKLAR	65

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral iskemi, beyin kan akışının azalmasına bağlı nöral dokular için gerekli oksijenasyonun kesintiye uğramasıdır(1).

İnme, yıllık yaklaşık 5.5 milyon ölüm oranıyla dünya çapında ikinci en büyük ölüm nedenidir. Aynı zamanda, hayatta kalanların %50'sinin kronik engelli olmasıyla dünya çapında engelliliğin önde gelen nedenidir(2) İnme iskemik ve hemorajik olarak kategorize edilebilir. Bunların yaklaşık olarak %88'ini iskemik inme oluşturur. İskemik inmelerin de yaklaşık olarak %70'i orta serebral arter(MCA) tıkanıklığına bağlı gelişir. Tıkanıklık sonucunda arterin beslediği bölgenin beslenememesine bağlı serebral iskemi ortaya çıkar. Serebral iskeminin risk faktörleri değiştirilemeyen(yaş, cinsiyet, genetik ve etnik köken) ve değiştirilebilen(sigara, alkol, hipertansiyon, obezite, diyabet ve diyet) risk faktörleri yer alır.

İskemik inme sürecinin karmaşık bir patogenezi olup serebral arterin tıkanmasıyla arterin beslediği bölgedeki hücrelerin yeterli miktarda oksijen ve beslenme ürünlerini alamamasıyla başlar. Beyin neredeyse enerjisinin tamamını oksidatif fosforilasyonla sağlar, bu yüzden yetersiz beslenme durumunda hücrelerde aerobik solunum baskılanır. Buna bağlı yetersiz ATP üretilir, yetersiz ATP durumunda ise hücreler anaerobik solunum yapar. ATP azalması sonucunda hücrelerde bulunan iyon pompaları bozulur. İyon pompalarının bozulması sonucunda hücre içine sodyum, klor, kalsiyum girişi artar; hücre dışına ise potasyum çıkar. Buna bağlı nöron ve glial hücreler depolarize olur. Anaerobik solunum laktat artar. Enerji yetersizliğinde eksitatör nörotransmitterler özellikle de glutamat salınır. Hücre dışında artan glutamatın, reseptörlerine bağlanmasıyla hücre içine daha fazla sodyum, klor ve kalsiyum girişine neden olur. Depolarizasyon böylece daha da artar. Hücre içinde kalsiyumun artması, birçok enzim sistemini aktifleyerek serbest oksijen radikali oluşmasına, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum hasarına, DNA hasarına, hücre membran hasarına, hücre şişmesine ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümü ise nekroz ve apoptozis mekanizmalarıyla gerçekleşir.

İskemik serebral inmede nekrotik dokulara karşı inflamatuvar bir süreç başlar. Özellikle ilk 24 saatte penumbra(kurtarılabılır doku) çevresinde immun hücreler toplanır.

Hücrelerin iskemik hasarla sonuçlanabilecek olaylarının engellenip veya yavaşlatılmasıyla iskemik hasardan korunmasına nöroproteksiyon denir. Nöroproteksiyonun temel hedefi penumbradır. Nöroprotektif ajanlar deney hayvanlarında etkili sonuçlar vermesine karşın insanlarda aynı etkiyi gösterememiştir. Bundan dolayı standart bir nöroprotektif ajan ortaya konamamıştır. Hücre ölüm mekanizma basamakları nöroprotektif ajanların asıl hedefidir.

Urapidil; sempatolitik bir antihipertansiftir. Aynı zamanda α_1 -adrenoseptör antagonisti olup 5-HT_{1A} reseptör agonisti olarak aktivite gösterir. Klinikte rutin bir şekilde kullanılan urapidil, vazodilatör etkisi nedeniyle antihipertansif bir ajan olarak kullanılmaktadır. Daha önceki yapılmış çalışmalarda vazodilatör etkisi bilinen urapidil'in iskemik olgularda reperfüzyon öncesinde uygulanmasıyla protektif bir ajan olarak kullanılabileceğine yönelik bulgular sunmuştur. Ayrıca literatürde, yine iskemi durumunda urapidil tedavisinin hücresel boyutta antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik aktivite göstererek koruyucu olduğuna dair bulgular bulunmaktadır.

Resveratrol; meyvelerde ve sebzelerde bulunan nöroprotektif etki amacıyla çok sık çalışılan polifenoldür. Resveratrol'un antioksidan, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkinliği de kanıtlanmıştır. Hidroksil, süperoksit gibi serbest oksijen radikallerini temizleyerek antioksidan etki gösterir. Yapılan deneysel çalışmalarda resveratrolün TNF- α üretimini ve nötrofil infiltrasyonu inhibe edip böylece serebral iskemi / reperfüzyon hasarını azalttığı ortaya konmuştur. Resveratrol'un aynı zamanda apoptozu azalttığı gösterilmiştir(61).

Deneysel çalışmamızda resveratrol ve urapidil kombine tedavisinin sıçanlarda deneysel serebral iskemi üzerindeki etkisi immunohistokimyasal ve histopatolojik açıdan değerlendirme amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemik İnme

Serebral iskemi, beyin kan akışının azalmasına bağlı nöral dokular için gerekli oksijenasyonun kesintiye uğramasıdır(1).

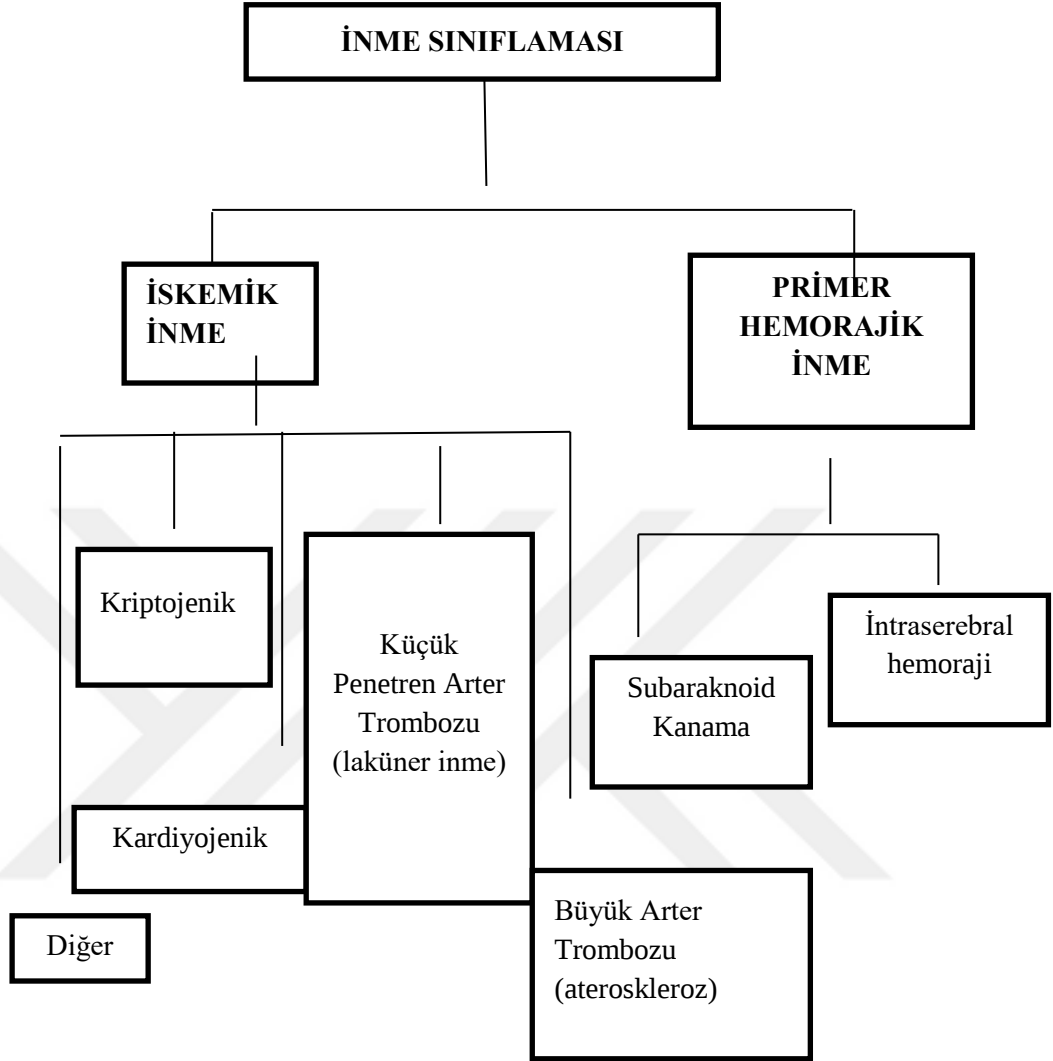
İnme, yıllık yaklaşık 5.5 milyon ölüm oranıyla dünya çapında ikinci en büyük ölüm nedenidir. Aynı zamanda, hayatta kalanların %50'sinin kronik engelli olmasıyla dünya çapında engelliliğin önde gelen nedenidir(2) İnme iskemik ve hemorajik olarak kategorize edilebilir. Bunların yaklaşık olarak %88'ini iskemik inme oluşturmaktadır. İskemik inmelerin de yaklaşık olarak %70'i orta serebral arter tıkanıklığına bağlı gelişir.

2.1.1. Epidemiyoloji

Epidemiyolojik verilerin çoğu, iskemik ve hemorajik(hem parankimal hemorajiler, hem de subaraknoid kanamalar dahil) serebrovasküler hastalığı inme çatısı altında birleştirse de, inmelerin büyük çoğunluğu (%87) iskemiktir.(3) Bu birleşik veriler böylece AIS'lerin epidemiyolojisini anlamak için makul bir başlangıç noktası benzerdir ve hipertansiyon, diabetes mellitus, atriyal fibrilasyon, yüksek kolesterol ve lipid seviyeleri, sigara/tütün kullanımı, fiziksel hareketsizlik, kötü beslenme, böbrek hastalığı ve aile sağılar. İnme için rapor edilen risk faktörleri genel kardiyovasküler hastalığa öyküsü/genetik yatkınlığı içerir.(3) Kadınlar, ırksal/etnik azınlıklar ve düşük eğitim geçmişine sahip olanlar da felçlerden orantısız olarak etkilenir. (3,4)

ABD'de, inme prevalansı 20 yaş ve üzeri kişilerde (toplam 7.2 milyon kişi) yaklaşık %2,7'dir ve yaşla birlikte 60 ve 80 yaş üstü kişilerde sırasıyla %6 ve %13'e yükselir. (3). Önleme, teşhis ve tedavideki ilerlemeler nedeniyle son birkaç on yılda felç ölüm oranları düşmüş olsa da, dünyada hala yılda 140.000'den fazla insan ölmektedir. Küresel olarak, inme prevalansı ve yıllık insidansı sırasıyla 42 milyon ve 16 milyondan fazladır ve inme, yıllık 6,3 milyon ölümden sorumlu olan ikinci önde gelen ölüm nedeni olmaya devam etmektedir(3)

2.1.2. İnme sınıflaması



Şekil 1. İnme sınıflaması

İnme temel olarak 2'ye ayrılır: Hemorajik ve iskemik inme. Diğer sınıflandırmalar ise bu temel sınıflama baz alınarak yapılmakta.

Subaraknoid hemoraji nedenli inme, tüm inmelerin % 5'ini oluşturmakta iken intraserebral hemorajili inme ise tüm inmelerin %10'nunu oluşturmaktadır.

Şu anda, uluslararası alanda en yaygın olarak kabul edilen iskemik inme alt tiplendirme sistemi TOAST (Trial of ORG 10172 in akut inme tedavisinde) sınıflandırma şemasıdır.(5)

2.1.3. Risk faktörler

İnmenin risk faktörleri değiştirilebilir faktörler ve değiştirilemez faktörler olara ikiye ayrılır

Değiştirilemez risk faktörleri:

Yaş: İnmenin en önemli risk faktörüdür. Yaşla beraber artmakla beraber 55 yaşından sonra her 10 yılda bir risk 2 kat artar.(6,7)

Cinsiyet: Erkeklerde inme insidansı daha yüksektir(E/K:1.25) fakat kadınların ileri yaş popülasyonu daha fazla olduğundan inme mortalitesi kadınlarda daha fazladır.(8)

Etnik köken: Etnik kökeni farklı insanlarda inme insidansı da farklılık gösterir.

Genetik: Hem değiştirilemeyen hem de değiştirilebilir risk faktörlerini etkileyebilir. Kişinin aile öyküsünde inme öyküsü olması inme riskini artırır. Tek gen mutasyonları inmeye sebep olabilecek patofizyolojiyi etkiler. Genetik bazı hastalıkların (orak hücreli anemi) klinik seyirleri inmeye neden olabilir. Genetik bazı polimorfizmler(9p21) de inmenin risk faktörü olabilir(9).

Değiştirilebilir risk faktörleri:

Hipertansiyon: İskemik inmede en önemli modifiye edilebilir risk faktörü hipertansiyondur. İskemik inmenin bütün alt tiplerinde riski arttırmaktadır. Hipertansiyon aynı zamanda sistematik çoklu organ hasarına sekonder iskemik inmeye neden olabilir(10,11).

Diyabet: İnme riskini 2-6 kat artırır, mortalite oranını da %20 artırır(12). Yapılan postmortem çalışmalarda diyabetli hastaların beyin dokuları incelendiğinde özellikle bazal ganglionlarda ve talamusta küçük serebral enfarktlar görülmüş. Diyabetli hastalarda laküner inme riski 2-3 kat daha fazla; geçici iskemik atak riski ise 3 kat daha fazla görülmektedir.

Sigara: İnme ile sigara arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Sigara içenlerde inme riski 1,6 kat daha fazla görülür(13). Sigara kandaki karbonmonoksit

(CO)'in artmasına neden olur. Artan bu CO endotel hasarı yapar. Ayrıca sigara kandaki fibrinojen miktarını ve trombosit fonksiyonlarına da etki eder. Bunların hepsi bir araya geldiğinde sigara içen kişilerde koagülasyona yatkınlık olur.

Atriyal fibrilasyon: İnmenin önemli risk faktörü olup yaşa bağımlı inme riskinin 2-5 kat artırır. İnmelerin yaklaşık olarak %24,6'sında atriyal fibrilasyon görülür. Genellikle kardiyembolik inmeler atriyal fibrilasyon ile birliktelik gösterir. Kardiyembolik inmeler geniş ve yaygın enfarktlara sebep olur.

Koroner kalp hastalığı: Ateroskleroz ile inme arasında doru orantılı bir ilişki mevcuttur. Aterom plak kalınlığı arttıkça inme riskini de artırır. Aorttaki aterom plaklarının kalınlığı 4 mm' den fazla olduğunda tekrarlayan inmeler açısından bağımsız bir risk faktörü oluşur.

Dislipidemi: Düşük LDL kolesterol düzeyi büyük arterlerde ateroskleroz gelişiminde koruyucu iken küçük damarlardaki aterosklerozu ve kardiyembolik inme gelişiminde koruyucu değildir. Düşük trigliserid oranı da inmede koruyucu olmayabilir. Yüksek HDL düzeyi ise küçük damarlarda ateroskleroz gelişiminde koruyucudur, ancak büyük arterlerde ateroskleroz gelişiminde ve kardiyembolik inmede koruyucu değildir(14).

Alkol: İnme ile alkol arasındaki ilişki tüketilen alkol miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Az ve orta miktarda alkol tüketimi (haftada 150-300 mg) inmeye karşı koruyucu iken aşırı miktarda alkol tüketimi (haftada 300 mg'dan fazla) inme için risk faktörü oluşturur(15). Günde 40 mg'dan fazla alkol tüketenlerde inme riskinin arttığını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur(16).

Fiziksel aktivite yetersizliği: Fiziksel aktivite yetersizliği inme riskini artırır. Beslenme alışkanlığında değişikliklerle beraber fiziksel aktivite inme riskini azaltır.

2.1.4. Radyolojik bulgular

BT: Bilgisayarlı tomografi(BT) çekimin kısa olması, kolay ulaşılabilir olması nedeniyle tanı ve tedavide zaman kaybını önlemede çok önemli bir rol oynar. BT inmenin tanısal çalışmasında esastır. Kontrastsız BT, hemorajik inmeyi ve diğer intrakraniyal yer kaplayan lezyonları hızla ekarte etmek için gerekli olan en yaygın

kullanılan görüntüleme tekniğidir. Ayrıca BT erken iskemik inme bulgularını gösterebilir ancak bunların sensitivitesi düşük spesifitesi yüksektir. Beyin iskemisi, erken BT bulguları; hipodansite(sitotoksik ödemden dolayı), gri-beyaz cevher farklılaşması, damardaki trombüsten kaynaklı hiperdens damar bulgusu ve ödemden dolayı sulkusların silinmesidir(17).

BT Angio: BT angiografi(BTA) vasküler tıkanıklıkları saptamak için büyük değere sahiptir ve endovasküler tedavi için adayları seçmek için kapsamlı inme merkezlerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Enfart alanını göstermesinin yanında diseksiyonu, anevrizmayı ve kollateral dolaşımı gösterebilir. Akut beyin enfarktüsünü saptamak için azalmış parankimalkontrast artışı(hipoattenüe alanlar) değerlendirir. Erken iskemik değişiklikler için duyarlılığı %65'e kadar artırabilir(18).

MRG: İnme teşhisi için altın standart olarak kabul edilir. MR'da DWI sekansı erken dönemde iskemik inmeyi saptamada daha sensitiv (%91-100) ve daha spesifiktir(%86-100). MR'da bazı sekanslar beraber değerlendirildiğinde (DWI/ADC/FLAIR/GRE) inmenin şiddeti ve kronikliği hakkında daha iyi bilgi verir. DWI moleküler harekete bağlı dokudaki su miktarını ölçer ve ADC'nin azalmasına bağlı arteriyel tıkanıklığı bir kaç dk ile saat içinde iskemik dokudaki değişikliği hiperintens gösterir. ADC'nin azalması temelde iyonik membran hemostazının bozulması ve sitotoksik ödemle ilişkili intraselüler alanda meydana gelir. Klinik açıdan DWI'de sinyal artışı ADC'de sinyal azalması takip ederse bu irreversibil iskemi belirtisidir. DWI'de lezyonun boyutu ve paterni önemli bir prognostik ve terapötik belirteçtir. DWI'nin paterni inme etyolojisi hakkında fikir verir. DWI'da 11 multiple lezyonlar kardioembolik etyolojiye yönlendirirken izole İntrikülostriat lezyon laküner enfarktı düşündürür(19,20).

2.1.5. İskemik inmenin tedavisi

Akut iskemik inmenin iki tedavi şekli mevcuttur; bunlar mekanik trombektomi ve intravenöz trombolizistir. İlk 6 saat içinde hastaneye başvuran hastalara Beyin BT ve Beyin BT Anjio çekilmelidir. Serum kreatinin düzeyi beklenip BT anjio geciktirmemelidir. Zaman kaybetmemek için BT Anjio ile Beyin BT beraber çekilmelidir.

İntravenöz tromboliz

AHA/ASA intravenöz tPA infüzyon tedavisini semptomların başladığı ilk 3 saat içinde hastaneye başvuran hastalara önermektedir. Bu tedavi ilk 4.5 saat içinde hastaneye başvuran uygun hastalara da uygulanabilir. İntravenöz tPA tedavinin başlanabilmesi için hastanın nörolojik semptomlarının olması, 18 yaşından büyük olması ve ilk 3-4,5 saat içinde hastaneye başvurması gerekir. Hastanın son 3 ay içinde kafa travma öyküsü, subaraknoid kanama(SAK) semptomları, intrakraniyal kitlesi, anevrizması ya da arteriovenöz malformasyon(AVM), geçirilmiş intrakraniyal cerrahi öyküsü varsa, aktif iç kanaması mevcutsa, sistolik tansiyonu 185 mmHg'dan diyastolik tansiyonu 110 mmHg'dan yüksekse, platelet(PLT) sayısı 100.000'den azsa, hasta son 48 saat içinde heparin almışsa ve aPTT normalden yüksekse, hastanın INR'si 1,7'den ya da PT'si 15'ten yüksekse veya kan şekeri 50 mg/dL'den küçükse intravenöz tPA verilmez.

Endovasküler tedavi

İntravenöz tPA tedavisi etkili bir tedavi olmasına karşın ilk 4,5 saatten sonra kullanılamaması ve büyük damar tıkanıklıklarında sınırlı etkinliğe sahip olması gibi tPA tedavisini sınırlayan kriterler mevcuttur(24).(21) Fransa Nörovasküler Topluluğu internal karotid arter(İCA) ve orta serebral arter(MCA) tıkanıklığı gibi proksimal tıkanıklıklarda mekanik trombektomi, intravenöz trombektomi ile birlikte tamamlayıcı bir tedavi olarak önerir. Büyük damar tıkanıklığı olup İntravenöz tPA kontraendikasyonu olan hastalara mekanik trombektomi önerilmelidir(25).(22)

2.2. Serebral Dolaşım ve Otoregülasyon

İnsan beyni, total vücut ağırlığının %2'si olmasına rağmen vücuttaki tüm oksijenin yaklaşık olarak %20'sini tüketmektedir. Beyine gelen ortalama kan miktarı 50 ml/100gr/dk'dır. Beyne gelen kan miktarı 20 ml/100gr/dk'nın altına düştüğü zaman nörolojik bozukluklar ortaya çıkar. İrreversibil değişiklikler ise gelen kan miktarı 10 ml/100gr/dk'nın altına düştüğünde başlar. Oksijenin serebral metabolizma oranı (CMRO₂) erişkinlerde yaklaşık olarak 3.4 ml/100gr/dk'dır ve 3.9-1.8

ml/100gr/dk arasında herhangi bir nörolojik değişiklik olmadan değişiklik gösterebilir(23).

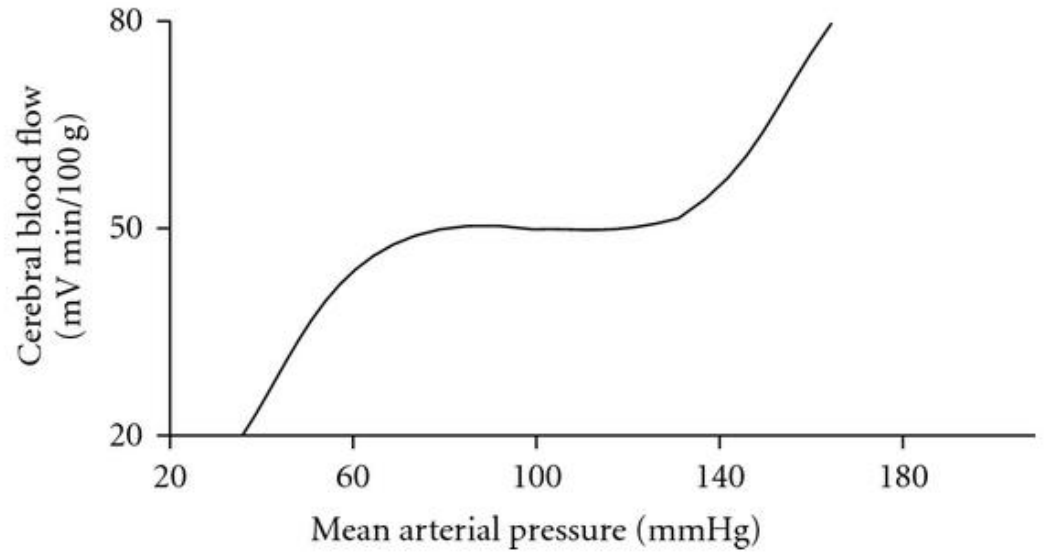
Glukoz beynin en temel enerji kaynağıdır. Beyin, yaklaşık olarak enerjisinin %90'ını glukozdan temin eder. 100 gr beyin dokusu dakikada 5.5 mg glukoz tüketir. Bu oran toplam vücut glukoz tüketiminin %25'ine denk gelir. Glukoz glikoliz ile piruvata yıkılır, piruvattan ise yeterli oksijen varlığında Asetil CoA oluşur. Asetil CoA, kreps siklusuna girer ve yeterli oksijen varlığında 1 mol glukozdan 38 mol ATP elde edilir. Oksijen yetersizliğinde ise glikoliz olayı durur ve piruvattan laktat oluşur. Anaerobik glikolizle 1 mol glukozdan 2 mol ATP üretilir. Hipokside enerji ihtiyacı artacağından dolayı daha fazla glukoz ihtiyacı doğar. Hipokside glukoz tüketimi artar. Yetersiz oksijen durumunda nöronlarda anaerobik glikoliz sonucunda toksik olan laktik asit üretimi artar. Bundan dolayı serebral fonksiyonların korunması için yeterli serebral kan akışının olması hayati öneme sahiptir. Serebral kan akışı serebral otoregölasyon mekanizmalarıyla dengelenmeye çalışılmaktadır.

İnsan beynindeki kan akışı ve otoregölasyon çok karmaşık mekanizmalarla düzenlenmektedir. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalarla büyük bir ilerleme kaydedildi. Ancak mikrosirkülasyon düzeyindeki araştırmalar halen devam ediyor(24).

Serebral kan akışında 3 ana düzenleyici mekanizma rol alır. Bunlar; otoregölasyon mekanizmaları, nörojenik kontrol ve kan akımı-serebral metabolizma ilişkisidir. Endotel ve astrositler bu mekanizmalarda rol alan temel hücrelerdir.

2.2.1. Otoregölasyon Mekanizmaları

Serebral arterlerin(özellikle arteriollerin) değişen serebral perfüzyon basıncı karşısında serebral kan akışının kontrol edilebildiğı süreç serebral otoregölasyondur. Serebral perfüzyon basıncı 50-150 mmHg'lik aralığında serebral kan akışı sabittir. Bu basınç aralığı serebral otoregölasyonun korunduğı aralık olarak değerlendirilir. Bu aralıktaki değerler dışındaki perfüzyon basınçlarında serebral kan akımında ciddi değişiklikler görülür (Şekil 2).



Şekil 2. Otoregülasyonun düzenlenmesi (33)

Serebral basınç otoregülasyon mekanizması vasküler düz kas, endotel ve perivasküler sinirlerle ilişkilendirilse de halen tam aydınlatılamamıştır. Artan kan akış hızının transmural basıçtan bağımsız olarak vazokonstriksiyonu tetiklediği gösterilmiştir(25). Endotel bu fizyolojinin temelini oluşturur. Endotel vazomodülatör birçok molekülünün dinamik kaynağını oluşturup mekanoreseptörlere sahiptir. Yapılan çalışmalarda endoteli çıkarılan damarlarda kan akış hızına karşı vazokonstriksiyon yanıtının zayıf olduğu ortaya konuldu. Yapılan başka bir çalışmada ise Harder vazokonstriksiyonda vasküler kaslardaki depolarizasyonun rol aldığını ortaya koydu(26).

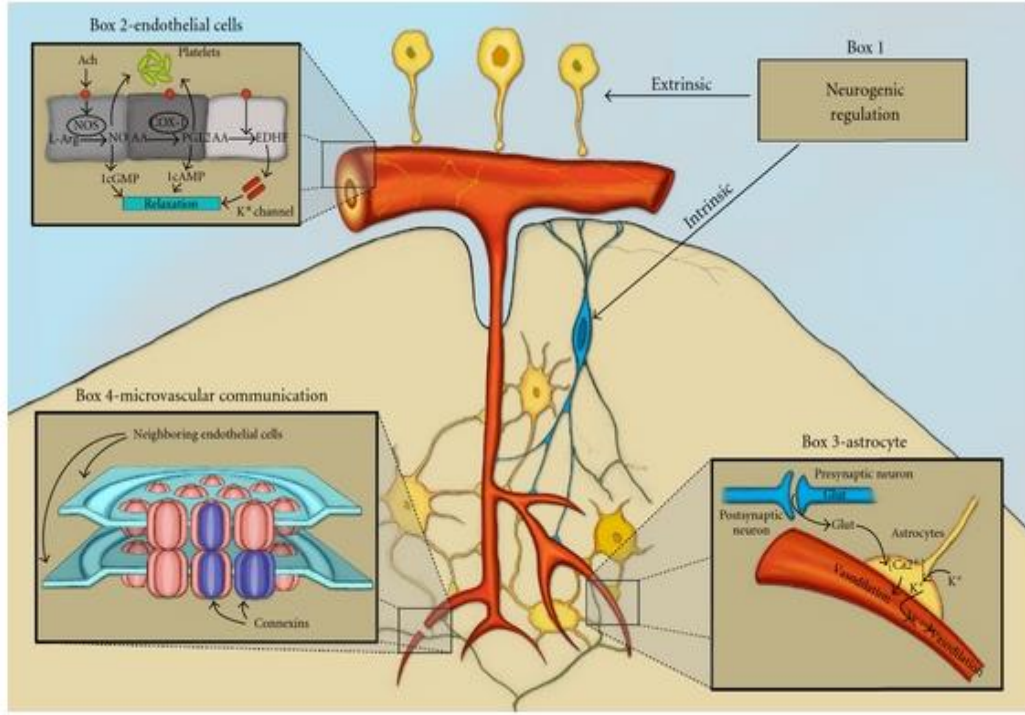
2.2.2. Kan akışı - serebral metabolizma ilişkisi

Serebral kan akımı ile serebral metabolizma arasında sıkı bir ilişki mevcuttur. Yapılan araştırmalarda daha çok serebral kan akışı ile serebral metabolizma arasında görev alan moleküller üzerinde durulmuştur. Bu moleküllerden olan hidrojen ve potasyum iyonlarının vazodilatasyonu tetikledikleri(27,28) ve böylece kan akımı ile serebral metabolizma arasındaki ilişkide rol oynadıkları ortaya konmuştur. Vasküler düz kaslarda ATP' ye duyarlı potasyum kanallarının bulunması kan akımı ile nöral aktivite arasında bir ilişki olduğunu gösterir(29).

2.2.3. Serebral kan akımının düzenlenmesi

Yapılan birçok çalışmada perivasküler sinirlerin serebral kan akışının düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Perivasküler sinirler, endotel hücreleri ve astrositler karmaşık bir ilişki içinde olup serebral kan akımının düzenlenmesinde rol alan temel nörovasküler bir ünedir. Perivasküler sinirler farklı köken ve farklı nörotransmitterlere sahiptir. Perivasküler sinirler intrinsik ve ekstrinsik olarak ikiye ayrılır. Ekstrinsik perivasküler sinirler parankim dışındaki perivasküler innervasyonu ifade eder. Ekstrinsik perivasküler innervasyonun üç ana kaynağı mevcuttur. Bunlar trigeminal ganglion, süperior servikal ganglion ve sfenopalatin ganglionudur. Bu ganglionlar sırasıyla duyuşal, sempatik ve parasempatik lifler taşır. Sempatik sistemin görevi kan basıncını serebral otheregölasyon mekanizmasının üst sınırının altında tutmaktır, parasempatik sistem ise patoloji varlığında daha çok görev alır. Trigemino-vasküler sistem ise temel olarak ağrıda rol alır aynı zamanda güçlü bir vazodilatör ajan olan kalsitonin geni ile ilişkili peptidin (CGRP) kaynağı olduğu gösterilmiştir(30).

Vasküler yapılar parankime girip virchow-robins boşluklarını terk ettikten sonra ekstrinsik innervasyonlarını kaybeder ve intrinsik innervasyonları başlar(31,32). İntrinsik perivasküler sinirler vasküler yapılarla doğrudan temas halinde olmayıp astrosit ayakçıklarıyla ilişki halindedir. Uyarılara bağılı serebral kan akımını artırıp azaltabilirler (Şekil 3).



Şekil 3. Serebrovasküler kontrolün birçok mekanizmayla düzenlenmesi (33)

2.2.4. Endotel

Serebral kan akışının düzenlenmesinde serebrovasküler endotel temel rol oynar. Daha önceleri basit bir antitrombotik bariyer olarak görev yaptığı düşünülen endotelin günümüzde vasküler düz kaslarla vasküler lümen arasında köprü görevi yapan dinamik bir yapı olarak kabul edilir. Endotel serebral kan akımını NO, endotelin, endotelden türetilmiş hiperpolarizasyon faktörü (EDHF) ve eikosanoidler sayesinde düzenler.

2.2.5. Astrositler

Serebral kan akışının düzenlenmesinde astrositler oldukça hayati bir göreve sahiptirler. Vasküler yapılara ayakçılarıyla tutunur ve serebral mikrovasküler yapılar arasında bağlantı sağlar. Astrositlerin hücre dışı potasyumu tamponladıkları düşünülmüyordu; ancak yapılan son in vitro çalışmalarda ayrıca nöronlar ve vasküler yapılar arasında iletişimi sağladıkları da gösterildi. Astrositlerin serebral kan akışının düzenleme mekanizmasıyla ilgili eski çalışmalar bunun potasyuma bağlı olduğu

üzerine odaklanmışlar. Ancak Zonta ve ark. yaptığı çalışmada astrositlerin hücre içi Ca^{++} artışı ile sonuçlanan bir glutamat reseptör alt tipini eksprese ettiğini ve bu nedenle astrosit ayakçıklarının sinaptik uyarıları algıladığı ve temas ettiği vasküler yapılarda vazodilatasyon yaparak cevap verdiği ortaya konuldu(33).

2.3. İskemik İnmede Patofizyoloji

İskemik inme bir dizi karmaşık olayların meydana gelmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu olaylar başlıca;

- Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği
- İskemik çekirdek ve Penumbra 25
- Eksitotoksisite
- Oksidatif stres
- Kan beyin bariyer bozukluğu
- Mikrovasküler bozukluklar
- Hiperkoagülasyon ve trombosit aktivasyonu
- İnflamasyon
- Hücre ölümü
- Reperfüzyon hasarıdır(34).

2.3.1. Hipoperfüzyona bağlı enerji yetersizliği

İskemik inme, beyne giden kan miktarının azalması sonucunda meydana gelen nörolojik hasardır. En sık nedeni tromboz veya embolidir. Bunların dışında arterit, hematolojik bozukluklar, küçük damarların ani tıkanması(laküner enfart), atriyel diseksiyon ve çeşitli genetik hastalıklar hipoperfüzyona sebep olabilir. Beyin enerjisinin tamamına yakını oksidatif fosforilasyonla sağlar. Bu yüzden ATP'nin azalması durumunda iyon pompaları bozulur ve nöron ve glial hücrelerde depolarizasyon gelişir. Oksidatif fosforilasyonun yetersiz olması sonucunda anaerobik solunum ve laktat artar. Laktatın artması ise enfarkt genişlemesi ve kötü sağkalımla ilişkilidir(35,36).

2.3.2. İskemik çekirdek ve penumbra

İskemik inmede kan miktarı 10 mL/ 100 gr doku /dakika'dan az kanlanan bölgelere iskemik çekirdek (core) denir. Bu bölgedeki hücreler inme başlangıcından birkaç dakika sonra fonksiyonlarını kaybeder. Gelen kan miktarı <25 mL / 100 gr doku /dakika' ten az, iyon kanallarının fonksiyonlarını korumak için yeterli fakat elektriksel aktiviteyi sürdürmek için yetersiz kalan bölgeye penumbra denir. Penumbra yapısal olarak sağlam fakat işlevsel olarak bozuk bir bölgedir. Bu bölgenin perfüzyonu düzeltildiği zaman penumbradaki hücreler fonksiyonlarını tekrardan kazanarak hücre ölümünden kurtulurlar. Bundan dolayı iskemik inmede tedavinin asıl hedefi penumbradır. Hipoperfüzyon düzeltilmediği takdirde enfarkt iskemik çekirdekten penumbraya doğru ilerler ve kurtarılabilecek dokular da kaybedilir. İskemik çekirdek ve penumbra ayrımı perfüzyon MRG, Diffüzyon MRG, PET, SPECT ve perfüzyon CT gibi radyolojik tetkikler ile yapılabilir(37).

2.3.3. Eksitotoksisite

Ölmekte olan hücrelerden anormal şekilde eksitator nörotransmitter salınması ve bu nörotransmitterlerin neden olduğu sekonder hasara eksitotoksisite denir. ATP'nin azalmasıyla Na/K ATPaz pompası bozulur ve hücrelerde depolarizasyon meydana gelir. Na/K ATPaz pompasının bozulmasıyla hücre içine sodyum, klor girip; hücre dışına potasyum çıkar. Aynı zamanda kalsiyum transportunda görevli pompaların bozulması sonucu hücre içi kalsiyum artışı olur(38). Enerji yetersizliği olan hücrelerde eksitator nörotransmitterler özellikle glutamat artışı olur. Hücre dışında glutamat birikmeye başlar. Hücre dışında artan glutamat AMPA NMDA ve kainat reseptörlerine bağlanarak kalsiyum, klor ve sodyum taşınmasını sağlar. Böylece nöronların daha fazla depolarize olmasına neden olup, nöronlardan daha fazla glutamat salınımına neden olarak iskemik kaskada katılırlar. Hücre içi kalsiyum artışı; fosfolipaz, kalpain, endonükleaz, siklooksijenaz, adenosin trifosfataz ve nitrik oksit sentetaz gibi enzimleri aktive eder. Bu mekanizmalarla hücre membran hasarına, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum hasarına, DNA hasarına, serbest radikal oluşumuna, NO üretimine, hücre şişmesine ve hücre ölümüne neden olur. Ekzotoksisite iskemi sonrası inflamasyona neden olan yolakları da aktifler.

2.3.4. Oksidatif stres

İnsan beyni, total vücut ağırlığının %2'si olmasına rağmen vücuttaki tüm oksijenin yaklaşık olarak %20'sini tüketmektedir. Nöronlar bu nedenle oksijene çok duyalıdır(39,40). Beyindeki antioksidan miktarı vücudun diğer bölümlerine kıyasla daha düşüktür. Glutamatın artması hücre içi kalsiyum artışına neden olur bu da ADPH oksidaz sentazı, ksantin oksidazı ve NO sentazı aktifleyerek serbest oksijen radikali oluşumuna sebep olur. Oksidan-antioksidan arasındaki dengenin bozulması hücre hasarı ile sonuçlanır. Aşırı miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin antioksidan savuma sisteminin kapasitesini aşması halinde oksidatif stres ortaya çıkar. Bu serbest oksijen radikalleri; nitrik oksit, hidroksil radikali süperoksid anyonu ve lipid radikalidir. Normalde bu radikaller hücrelerde düşük seviyelerde bulunur ve önemli birçok fonksiyonlarda rol oynarlar. Aşırı miktarda üretilen bu radikaller DNA'ya, proteinlere, yağ asitlerine ve lipitlere zarar verirler(41). Ayrıca metalloproteazları aktive ederek ve endotel hasarına neden olarak kan beyin bariyerini(KBB) de bozarlar.

2.3.5. Kan Beyin Bariyer Bozukluğu

Kan beyin bariyeri (KBB); bazal lamina, endotelial hücreler, nöronlar, astrositler, perisitler ve hücre dışı matrixten oluşur(42). İskeminin başlamasından 2 saat sonra endotelial bazal membranın fonksiyonu kaybolmaya başlar(42). Bu olayın ardından KBB geçirgenliğinde artış olur. Erken reperfüzyon KBB değişikliklerini geçici olarak hafifletebilir, ancak trombolitik tedavi ve geç reperfüzyon kullanımı tersine endotel hasarını şiddetlendirebilir. KBB'nin fonksiyon bozukluğuna matriks metalloproteinaz trombin, vasküler endotelial growth faktör, bradikinin ve diğer proteazların birikmesi neden olur. Daha önce anlatıldığı gibi oksidatif stres kan beyin bariyeri fonksiyon bozukluğuna neden olur ve nöronlardan, endotelial ve glial hücrelerden matris metallopeptidaz (mmp) 9 salınımını indükler. Enfarkttan 24-72 saat sonra KBB' nin bozulmasının ikinci aşaması başlar ve bu aşamada lökosit infiltrasyonu meydana gelir. Sonuç olarak enfarkttan 24-72 saat sonraki süreçte daha fazla doku kaybı meydana gelir. KBB' bozukluğu

sonucunda beyin parankimine sızıntılar olur. Sızan büyük molekülü bileşenler beraberlerinde suyu da ekstrasvasküler alana çekerler. Sonuçta vazojenik ödeme neden olurlar(43).

2.3.6. Mikrovasküler hasar

İskemi, endotel hücrelerin fonksiyonlarını ve otoregülasyonu bozarak mikrovasküler hasara neden olur. Serebral otoregülasyon kan basıncı değişikliklerine karşı serebral perfüzyon basıncını belli aralıklarda tutabilme yeteneğidir. İskemide serebral perfüzyon basıncı düşer, bu yüzden serebral kan akımı arteriolar dilatasyonla korunmaya çalışılır. Burada vasodilatasyondan sorumlu mekanizmalar(hipoksi, karbonmonoksit, asidoz ve adenozin), myojenik faktörler ve endotelyal faktörler (endotelin 1, nitrik oksit ve prostasiklin)rol oynar. İskemide endotel hasarı meydana gelir. Endotel hasarı meydana geldiğinde ise nitrik oksit ve prostasiklin salınımı azalır, endotelin 1 üretimi artar. Bunlar vasküler tonusu artırarak iskemik enfart ve kollateral damarlar alandaki kan akışı daha da bozarak penumbranın beslenmesini daha fazla bozarlar.

2.3.7. Hiperkoagülasyon ve trombosit aktivasyonu

İskeminin patofizyolojisinde Tromboz ve trombosit aktivasyonu önemli bir rol oynar. Endotel hasarında ortaya doku faktörü çıkar. Doku faktörü, faktör VIIa ve fosfolipitlerle beraber faktör IX ve faktör X'u aktifler. Faktör X, protombinaz kompleksiyle birlikte protrombinden trombin oluşumunu tetikler. Trombin, fibrinojenden fibrin oluşumuna yol açarken aynı zamanda fXIII'ü de aktifler(44). Fibrin molekülleri bir araya gelerek pıhtıyı oluşturmak için eritrositleri, pıhtılaşma faktörlerini, trombositleri yakalar. Trombin ile aktive edilebilir fibrinoliz inhibitörü olarak da adlandırılan prokarboksipeptidaz U'nun trombin, plazmin veya trombin/trombomodulin kompleksi tarafından aktivasyonu, fibrinolizi azaltan karboksipeptidaz U ile sonuçlanır. Fibrin, integrin reseptörü α Ib β 3 yoluyla trombositlere yapışır. İskemide trombositler aktive olur. Aktive trombositler 2 saat içinde hasarlı damarlarda toplanmaya başlar. Trombositlerden çeşitli

biyokimyasal mediyatörler salgılanır. Salgılanan serbest oksijen radikalleri ve tromboksan A2 geçici vazospazma neden olurken aynı zamanda lökosit migrasyonu için salınan bazı kemotaktik mediyatörlerle de inflamasyon daha da şiddetlenir(45).

2.3.8. İnflamasyon

İskemik inmede nekrotik dokulara karşı inflamatuvar bir yanıt oluşur. İskemik endotel hücrelerden salgılanan sitokinler/kemokinler mikrogliaları aktive eder. Aktive mikroglialar, adhezyon moleküllerinin salınımını tetikleyen proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. Bu olaylar enfarkt başlangıcından sonra ilk 24 saatte meydana gelir. Kemokinler, immun sistem hücrelerinin özellikle penumbra çevresinde toplammasına neden olurlar. Adhezyon molekülleri (selektinler, integrinler, immünoglobulin süper ailesi) lökosit-endotel adhezyonuna neden olarak mikrovasküler oklüzyona neden olurlar. Bu da hipoperfüzyona ve no reflow fenomenine neden olur. Aynı zamanda lökositlerin iskemik beyin parankimine girmesine neden olurlar. İnflamasyon hücreleri kan beyin bariyerini de bozup hasarı daha da şiddetlendirirler. İskemi sempatik sistemi ve hipotalamo hipofizer-adrenal aksı da aktifleyerek dolaşımdaki bağışıklık hücrelerin beyne girişinde rol oynar. Bu da iskemide dolaşımdaki bağışıklık hücre sayısını azaltıp daha fazla bulaşıcı komplikasyonlara yol açar.

İnflamatuvar hücrelerden olan lökositler, hem endotel duvarına yapışarak hem de serbest oksijen radikalleri, proteaz, jelatinaz, kollajenaz üreterek kurtarılabılır vasküler yapılara ve parankimal dokuya zarar verir. Lökositler ayrıca trombosit agregasyonuna ve vazokonstrüksiyona neden olan PAF, prostoglandinler, eikozanoidler, lökotirenler salgırlar. İskemik beyne en erken giren lökosit nötrofillerdir. Geçici iskemiden 4-6 saat sonra kalıcı iskemiden ise 12 saat sonra iskemik dokuda görülürler.

İskemik inmede inflamasyonda rol alan bir diğer hücre lenfositlerdir. Bunlar nötrofillerden yaklaşık 3-6 gün sonra iskemik dokuda görülürler. Bunlar da proinflamatuvar sitokinler üretirler. B lenfositlerden ziyade T lenfositler rol alırlar.

İnflamatuvar hücrelere ek olarak astrositler de inflamasyonda rol alan moleküller üretirler. Astroglial yanıt iskemiden yaklaşık 4-24 saat sonra başlar. 28 güne kadar uzayabilir. Nöronlar, astrositler, endotel hücreleri tarafından üretilen ve TNF süper ailesi üyesi olan TWEAK, astrositlerdeki Fn14 reseptörüne bağlandığında proinflamatuvar moleküller salgılanır.

İnflamasyonda rol alan temel mediyatörler ise sitokinler, kemokinler, araşidonik asit metabolitleri, nitrik oksid/nitrik oksid sentetaz ve metalloproteinazlardır.

2.3.9. Hücre ölümü.

İskemik inmeden sonra onarıcı sistemlerle hasar verici sistem arasında hassas bir denge vardır. Hasar verici sistemler daha baskın olduklarında hücre ölüm mekanizmaları devreye girer. Hücre nekroz yoluyla ölürse, çevreye daha fazla glutamat ve toksin salarak diğer nöronları da etkiler. Bu yüzden birçok beyin hücresi hücrelerin minimal inflamasyon veya genetik materyal salınımı ile programlanmış hücre ölümü olan apopitoza uğrar. Sürecin apopitoza mı nekroza mı gideceğini belirleyen faktörler; lokal iske mi derecesi, hücre olgunluğu, hücre içi serbest Ca ++ konsantrasyonudur. Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, reaktif oksijen radikallerinin artışı, hücre içi potasyumun azalması ve toksik çinko akışının artması apopitozu tetikler.

Apoptozis: Ekzositozla hücre içi kalsiyum artar ve mitokondrilerde birikir. Fonksiyonu bozulan mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c hücre ölümüne neden olan kaspazları aktive eder. Bu kaspazlar apoptozun ana etkenleridir. Apoptoz enerji bağımlı bir olaydır ve enerji üretimi devam eden penumbra da etkindir. Mitokondrideki apoptoz, esas olarak proapoptotik (bax, bak) veya antiapoptotik (bid, bcl 2) olan b hücreli lenfoma-2 (bcl-2) tarafından düzenlenir(46). Proapoptotik proteinler sitoplazmaya salındıktan sonra kaspazları aktive ederler. Kaspaz 3 apoptozu yöneten ve son kaspazdır. Bu enzim proteinleri, nükleotidleri ve enzimleri keserek hücre ölümüne neden olur. Apoptozisde hücre membran yapıları son ana kadar korunur ancak nekroz hücre sel şişme ve hücre membran bozukluğuyla başlar.

Mitokondrinin yanı sıra endoplazmik retikulum da kaspazları aktifleyerek hücre ölümüne neden olur(47).

Nekroz: İskemik çekirdekte kan miktarının azalması sonucu hücrelerin ATP ihtiyacı karşılanamaz. ATP yetersizliğinde hücre mebranında bulunan Na/K ATPaz pompasının bozulmasına neden olur. Bu pompanın fonksiyonu bozulunca hücre içinde sodyum miktarı artar. Sodyumla beraber hücre içine su girer ve hücrel şişme başlar. Bu olay devam ederse hücre zarı parçalanarak hücre içeriği hücre dışına çıkar. Bu hücre içi içeriğin dışarı salınması inflamasyona neden olur. Hücre içeriğin dışarı salınması, hücre membran bozukluğu, sitoplazmanın vakuolizasyonu, proinflamatuvar maddelerin varlığı ve ölen hücrelerde ve çevrelerinde inflamasyonun varlığı nekrozun morfolojik özellikleridir.

2.3.10. Reperfüzyon hasarı

Enfarkt alanına yeniden kan akışının sağlanması penumbra için çok önemli olup klinik sağkalımı da etkiler. Reperfüzyon paradoksal bir şekilde hasarı daha da artırabilir. Ciddi iskemisi olan hastalarda erken rekanalizasyon hastalarda mikrovasküler hasara bağlı olarak hemoraji riski artar. Lökositler endotel hasarına, mikrosirkülasyonda obstrüksiyona, kan beyin bariyerinin bozulmasına, beyin dokusuna infiltre olarak reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Trombositler no-reflow fenomeni aracılığıyla reperfüzyon hasarında lökositlerle sinerjistik rol oynar ve çeşitli biyokimyasal mediyatörler salgılayarak reperfüzyon hasarını artırır. Ayrıca iskemi sonrası hiperperfüzyon ödeme ve kanamaya neden olur.

2.4. Deneysel Serebral İskemi Modelleri

Mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biri inmedir. İnmelerin yaklaşık olarak%88'ini iskemik inmeler oluşturur. İnsanlardaki serebral iskemiye taklit etmek için farklı farklı deneysel modeller oluşturulmuştur. Bu modeller iskemik beyin hasarında meydana gelen patofizyolojik değişiklikleri anlamamıza imkan sağladığı gibi yeni tedavi stratejileri ve nöroprotektif tedavi stratejilerinin

gelişmesine yardımcı olabilir. Bu deneysel çalışmalarda seçilen iskemi modelleri insanlarda meydana gelen serebral iskemi kliniğini ve laboratuvar bulgularını en iyi yansıtan en uygun model olmalıdır.

Bu deneylerde karşılaşılan en büyük sıkıntı, sonuçlardaki değişkenlik düzeyinin kontrolündeki zorluklardır. Bu zorluklar; değişik parametrelerin fazla olması ve bu değişken parametre sıkı kontrol edilmediğinde değişkenliğin artması durumunda deneysel modelin kabul edilebilirliği ortadan kalkabilir(48,49). Deneysel iskemi modelinin sonucunu birçok değişken etkiler. Bunlar yaş, cinsiyet, ırk, kullanılan anestezipler, cerrahinin tekrarlanabilmesi ve kan şekeri düzeyi deneysel modeli etkileyebilir. Hiperglisemi iskemik beyinde mevcut hasarı kötüleştirdiğinden deney hayvanlarının kan şekeri düzeyleri takip edilmelidir. Ayrıca deney hayvanlarının vücut sıcaklıkları da yakın takip edilmelidir(48,50).

Transgenik hayvanlar, spesifik gen delesyonlarının iskemik beyin hasarındaki etkilerini görmemize yardımcı olur. Bu sebeple deneylerde genellikle fareler kullanılır. İskemiye en meyilli fare ırkı C57BL/6 ırkıdır(51,52). Hayvanlardaki deneysel serebral iskeminin modelleri hem iskemi tedavisinde hem de reiskemi patofizyolojisinde yol göstericidir. Bu modellerle yeni ilaçların denenmesine imkan sağlanır. Deneysel iskemi modellerinde ratlar en çok kullanılan hayvanlardır. Bunun en önemli nedeni çalışmaların tekrarlanabilir olması yanı sıra rat damarlarının anatomi ve fizyolojisinin insaninkine benzemesi, türleri arasında homojenlik olması parametrelerin kolayca izlenebilmesi ve beyin dokularının kolayca fiks edilebilmesidir.

İskemi modelleri fokal ve global iskemi modelleri olarak 2' ye ayrılır.

2.4.1. Fokal Serebral İskemik İnme Modelleri

- **İntraluminal suture MCAo modeli**

İskemik inmelerin yaklaşık olarak %70'i MCA oklüzyonu nedeniyle ortaya çıkar. Bu nedenle deneysel çalışmalarda daha çok MCA oklüzyonu üzerinde durulmaktadır. MCAo modellerinde 2 teknik yaygın olarak kullanılmaktadır. Birinci

teknik; geçici olarak karotis kommunis bağlanır ve suture buradan MCA tıkanıcaya kadar ilerletilir. İkinci teknik ise external karotid arter kesilir ve suture buradan internal karotid arterden ilerletilerek MCA bifurkasyonuna kadar ilerletilir ve MCA'ya kan akışı kesilir. External karotid arterin kesilmesi anatomik bütünlüğü bozmadığı için reperfüzyon için anlamlı bir kan akış eksikliğine neden olmaz. Bu nedenle bu teknik daha idealdir.

MCAo tekniğinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Avantajları; bu modelde insanlardakine benzer bir penumbra alanı oluşur, iskemi süresi ve reperfüzyonun kontrolü kolaydır. Dezavantajları ise kullanılan suture bağlı olarak yetersiz oklüzyona ve subaraknoid kanamaya neden olabilir.

- **Kraniyektomi modeli**

Bu modelde MCA'yı doğrudan ortaya koymak için kraniyektomi gerekmektedir. Distal MCAo için 2 teknik geliştirilmiştir. Birinci teknik parotis, temporal kas, zygomatic ark ve MCA'yı örten kafatasının çıkarılması şeklindedir. Daha sonra MCA elektrokoagülasyon, fotokimyasal, mikroanevrizma klipsler gibi yöntemlerle oklüde edilir. 3 damar oklüzyon (3VO) modeli denilen ikinci teknikte ise ek olarak kollateral dolaşımı da minime indirmek için her iki karotis kommunis de tam veya kısmi oklüde edilir. Bu yöntemde frontal, temporal, parietal, oksipital korteksin büyük çoğunluğunda iskemi oluşturur.

Bu modelin avantajları; MCAo direkt olarak gözle görülebilir, düşük mortaliteyken dezavantajları arasında yüksek cerrahi teknik bilgi gerektirmesi, parankim hasarı, vasküler hasarlar, kafa içi basıncını etkilemesi sayılabilir.

- **Endotelin -1 modeli**

Güçlü ve uzun etkili bir vazokonstriktör olan ET-1, doğrudan beyne enjekte edilerek beyin kan akışını iskemik inme oluşacak seviyelere kadar düşürür. ET-1, korteks topikal uygulanarak, intraserebral enjeksiyon ve MCA yakınına enjeksiyon gibi yöntemler kullanılarak fokal iskemi indüklenebilir.

ET-1 modelinin avantajları; işlemin basit ve hızlı olması, mortalite ve morbiditenin düşük olması, vazokonstriktör derecesi verilen ilaç dozuyla ayarlanabilmesi, ekstrakraniyal damarların manüplasyonuna gerek olmaması sayılabilir. Dezavantajları ise iskemi süresinin kontrol edilememesi, tekrarlanabilirliğinin zor olmasıdır(53,54).

2.4.2. Global Serebral İskemik İnme Modelleri

- **Boyun turnike tekniği**

Bu teknikte venöz tıkanıklık ve vagus siniri sıkıştığından istenilen iskemi karmaşık hale gelir. Bu tekniğin bir diğer dezavantajı ise vertebral arterler foramen vertebrale içinde olduğundan vertebral arterlerin kapatılamaması sonucu istenilen global iskemi elde edilemez. Modifiye edilen bu teknikte daha çok kedi, köpek ve maymunlar kullanılır.

- **Ventriküler fibrilasyon tekniği**

Bu teknik daha çok kardiyak arresti taklit etmek için kullanılır. Bazı araştırmacılar bu tekniğe CPR da eklemişlerdir. Genellikle büyük hayvanlarda kullanılan bu teknik ideal olmasına rağmen pahalı ve oldukça yorucudur. Kofler ve ark. bu tekniği farelere modifiye etmiştir. KCL ile kardiyak arrest oluşturulduktan sonra CPR protokolü uygulanmış. CPR'dan sonra hippokampal ve kaudoputamen hasarı görüldü(55).

- **4 damar oklüzyon tekniği (4V0)**

Bu teknikte her iki vertebral arter alar foramende koagüle edilir, 1 gün sonra her iki karotis kommunis geçici oklüde edilir(56). Bu teknik hayvanların yaklaşık olarak %50-70'inde başarılı iken iskemi etkileri ratlar arasında farklılık gösterir. Bu farklılık ratlar arasındaki kollateral dolaşım farklılığına bağlanmaktadır. Modelin kullanımının zor olması, çalışmalar arasında farklılık göstermesi, başarı oranının %50-70 arasında olması dezavantajlarındandır.

- **2 damar oklüzyon tekniği (2VO)**

Bu iskemi modelinde karotis kommunislerde hipotansiyonla geçici oklüzyon oluşturulur. Sadece kanamayla veya fentolamin, trimetafan gibi ajanlarla desteklenmiş kanamayla tansiyon 50 mmHg seviyelerine indirilir. 5-15 dakikalık iskemi sonrası serebral kan %5 seviyelerine inmektedir. İskemi sonrası hippokampüste, kaudoputamende ve neokortexte değışiklikler meydana gelir. 2VO tekniğinin 4VO tekniğine göre avantajları; daha basit cerrahi işlem gerektirmesi, reperfüzonun kolaylıkla gerçekleştirilmesi, düşük mortalite sayılabilir. Ancak çeşitli ajanlarla hipotansiyon yapıldığında verilerde karışıklığa neden olması dezavantajındandır(57).

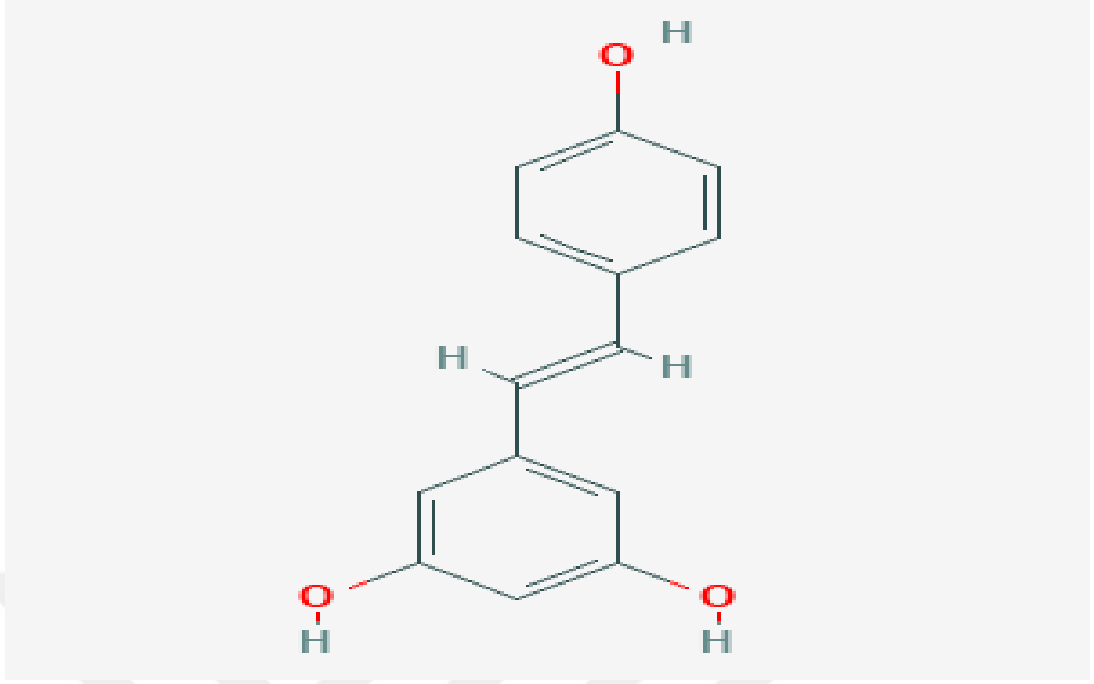
- **Kafa içi basıncı yükseltilmesi tekniği**

Bu tetknikte sisterna magnadan sıvı enjekte edilir. Kafa içi basıncı artırılarak ortalama arteryel basıncın 25-50 mmHg üzerine çıkarılır. Böylece serebral kan akımı azaltılır ve geçici iskemi modeli oluşturulur. Ancak ortaya çıkan patoloji sadece iskemiden kaynaklanmayıp esas olarak kafa içi basıncı artışından etkilenmesinden dolayı ortaya çıktığından istenilen sonuçlar elde edilememiş olup kullanımı sınırlı kalmıştır(58).

2.5. İlaçlar

2.5.1. Resveratrol

Resveratrol 228,24 g/mol molekül ağırlığında olup 254 °C erime ısısına sahiptir. Moleküler formülü C₁₄H₁₂O₃'tür. Kimyasal yapısı şekilde gösterildiği gibidir (Şekil 4). IUPAC adı [(E) -2- (4-hidroksifenil) etenil] benzen-1,3-diol'dür. Su, etanol, DMSO, dimetil formamid gibi organik çözücülerde çözünür.



Şekil 4. Resveratrol kimyasal yapısı

Başlıca nöroprotektif, antiinflamatuvar, antikanserojenik, kardioprotektif olmak üzere birçok etkisi olan bir fitoaleksindir. Üzümde, kırmızı şarapta, yer fıstığında olmak üzere 70'ten fazla bitkide bulunur. Resveratrolün biyoyararlanımı düşük olmasından dolayı modifikasyonu üzerinde yoğun çalışılmıştır. Bu nedenle metoksillenmiş, hidroksillenmiş, halojenlenmiş türevler üretildi. Resveratrol, PI3K / AKT / mTOR ekspresyonunu düzenleyerek iskemik inmede apoptozu, nöronal hasarı ve enfarkt alanını azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur(59,60). Resveratrol JAK2 / STAT3'ü aktive ederek, PI3K / AKT / mTOR ekspresyonunu aktive eder. Aktive olan PI3K / AKT / mTOR, BLC-2'nin artmasına, BAX'in azalmasına ve kaspaz-3'ün bölünmesine yol açarak apoptozu inhibe eder. Yapılan son çalışmalarda resveratrol ayrıca hipokampal nöronları geçici serebral iskemik hasardan koruyabildiğini göstermektedir(60).

Resveratrol, aynı zamanda oksidatif strese karşı SIRT1(sirtuin 1)/AMPK/PGC1 α yolağını etkileyerek mitokondriyal aktiviteyi ve biyogenezi iyileştirir. Tavşan modelinde yapılan bir çalışmada ise resveratrol NF- κ B, TNF- α , İL-6, siklooksijenaz-2, makrofaj enflamatuvar protein-2, oksijen radikallerini ve kaspazları inhibe ederek anti inflamatuvar etki gösterdiği görülmüştür(61).

Resveratrol inflamasyonda TLR-4 / MyD88 / NF-pathB sinyal yolunu da inhibe eder. İdeal resveratrol dozunu belirlemek için birçok in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmıştır. Yüksek doz resveratrol verilen fareler (1800 mg / kg) 3-4 ay içinde ölmüşlerdir(62). İnsanlarda günde 5 gr a kadar resveratrolün güvenli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(63). Ancak bu çalışmalar sağlıklı popülasyonda yapıldığı için ideal doz için çalışmalar sürmektedir. Ayrıca oral yoldan verilen resveratrolün bağırsak florası tarafından metabolize edilmesi hangi etkilerin resveratrole ait olduğu hangi etkilerin metabolitlerine ait olduğu belirsizdir. Bu nedenle en uygun uygulama yolunu da bulmak gerekmektedir.

2.5.2. Urapidil

Urapidil, 387,484g/mol molekül ağırlığında olup molekül formülü C₂₀H₂₉N₅O₃'tür. Urapidil, postsinaptik α 1-adrenoseptörlerinde antagonistik bir etki ile periferik vasküler direnci düşürür. İlaç, periferik α 2- ve β -adrenoseptörler ile etkileşime girebilse de, bunun klinik olarak anlamlı etkilerle sonuçlandığı görülmemektedir. Merkezi etki bölgesi arka beyin gibi görünmektedir ve hayvan çalışmaları, urapidilin merkezi serotonin 5HT_{1A}'da rekabetçi bir antagonist olduğunu göstermektedir ilacın antihipertansif ve negatif kronotropik etkilere sahip olduğu reseptörler. Urapidil, hipertansiyonlu hastalarda noradrenalin (norepinefrin) duyarlılığını azaltarak da etki edebilir, böylece olası artan plazma noradrenalin konsantrasyonlarına rağmen kan basıncını düşürür. Hayvan çalışmalarında, urapidil, tolerans geliştirmeden toplam periferik direnci azaltmıştır. Deneysel olarak indüklenen taşikardiyi tersine çevirebilir, ancak bradikardi üzerinde çok az etkisi vardır. İlaç, yüksek dozlarda antiaritmik özelliklere sahiptir. Urapidil, intrakraniyal kan basıncını değiştirmeden sistemik hipertansiyonu azaltıyor gibi görünmektedir.

Urapidil, kardiyak disfonksiyonu olan hastalarda karşılaştırmalı olmayan akut çalışmalarda test edilmiş ve kan basıncını düşürdüğü ve kalp hızını koruduğu bulunmuştur. Ön yükte(yani pulmoner kapiller kama basıncı veya pulmoner arteriyel diyastol sonu basıncı), ortalama arter basıncında, ortalama pulmoner arter basıncında ve art yükte azalmalar, atım hacminde ve kardiyak çıktı ve indekste görülen iyileşmelerle birlikte çoğu çalışmada meydana geldi. Urapidil, hipertansiyonlu

normorenal hastalarda renal kan akışını artırma ve renal vasküler direnci azaltma eğilimindedir, bazı çalışmalarda plazma renin ve aldosteron aktivitesinde eşzamanlı artışlar kaydedilmiştir. Hem hipertansiyonu hem de böbrek yetmezliği olan hastalarda renal kan akışında değişiklik olmaksızın hem renin hem de aldosteron aktivitesinde artışlar görülmüştür. Her ikisi de in vitro çalışmaları ve klinik deneyler, urapidilin lipid ve glukoz metabolizması üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermiştir. Pulmoner vasküler yatakların sistemik vaskülatürden daha fazla genişlemesine neden olduğu görüldüğünden, urapidil pulmoner hipertansiyonu sistemik hipotansiyona neden olmadan azaltabilir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda, urapidil istirahat ve egzersiz sırasında sistemik ve pulmoner arter basınçlarını önemli ölçüde düşürdü ve bu hastalarda egzersiz sırasında gaz değişimini iyileştirebilir.

Yapılan çalışmalarda urapidil 'in kan-beyin bariyerini geçtiği bildirilmiştir. Urapidil karaciğerde geniş ölçüde metabolize edilir. Oral urapidilin uygulanmasından sonraki 24 saat içinde, dozun yaklaşık %50 ila %70'i ana bileşik (%10 ila 15) ve 3 metaboliti - ana metabolit, aril-p-hidroksile urapidil (M1, yaklaşık %30) ve 2 minör metabolit, O -demetile urapidil (M2) ve urasil-N-demetile urapidil (M3). M1 ihmal edilebilir bir antihipertansif aktiviteye sahiptir, ancak hayvan çalışmalarında M2 ve M3'ün ana ilaca benzer antihipertansif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Terapötik urapidil dozlarında M2 ve M3'ün serum konsantrasyonları düşük olduğundan, eğer varsa, urapidilin antihipertansif etkisindeki rolleri belirsizdir.

Hafif ile şiddetli esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda yapılan karşılaştırmalı olmayan deneyler, günde iki kez 30 ila 120 mg urapidilin, kalp atış hızını değiştirmeden veya postural hipotansiyona neden olmadan 12 haftalık tedaviden sonra ortalama sistolik ve diyastolik kan basınçlarını %9 ila 18 oranında azalttığını göstermiştir. Hipertansiyonu olan 6825 hasta üzerinde yapılan karşılaştırmalı olmayan bir çalışmada, 6 haftalık tedavi sırasında urapidilin hiperlipidemi, koroner kalp hastalığı veya diyabet üzerinde hiçbir etkisi bulunmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel çalışmamızı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayını aldıktan sonra Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma Ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirdik.

Çalışmamızda rastgele seçilmiş yaklaşık olarak 250-300 gr ağırlığında 35 adet Sprague Dawley cinsi dişi ratlar kullanıldı. Deney süresi boyunca ratlar ideal laboratuvar koşullarında (sessiz ortam, %50-60 nem ortamında, 22-24 derece sıcaklıkta) takip edildi. 12 saat gündüz 12 saat karanlık döngüsü uygulandı ve standart yem ile beslendiler. İdeal ölçülerdeki kafeslerde tek başlarına takip edilen ratların kafesleri düzenli aralıklarla temizlendi.

1 haftalık grup içi adaptasyonları takiben ratlar rastgele seçilip 7'li 5 grup oluşturuldu.

3.1. Deney Grupları

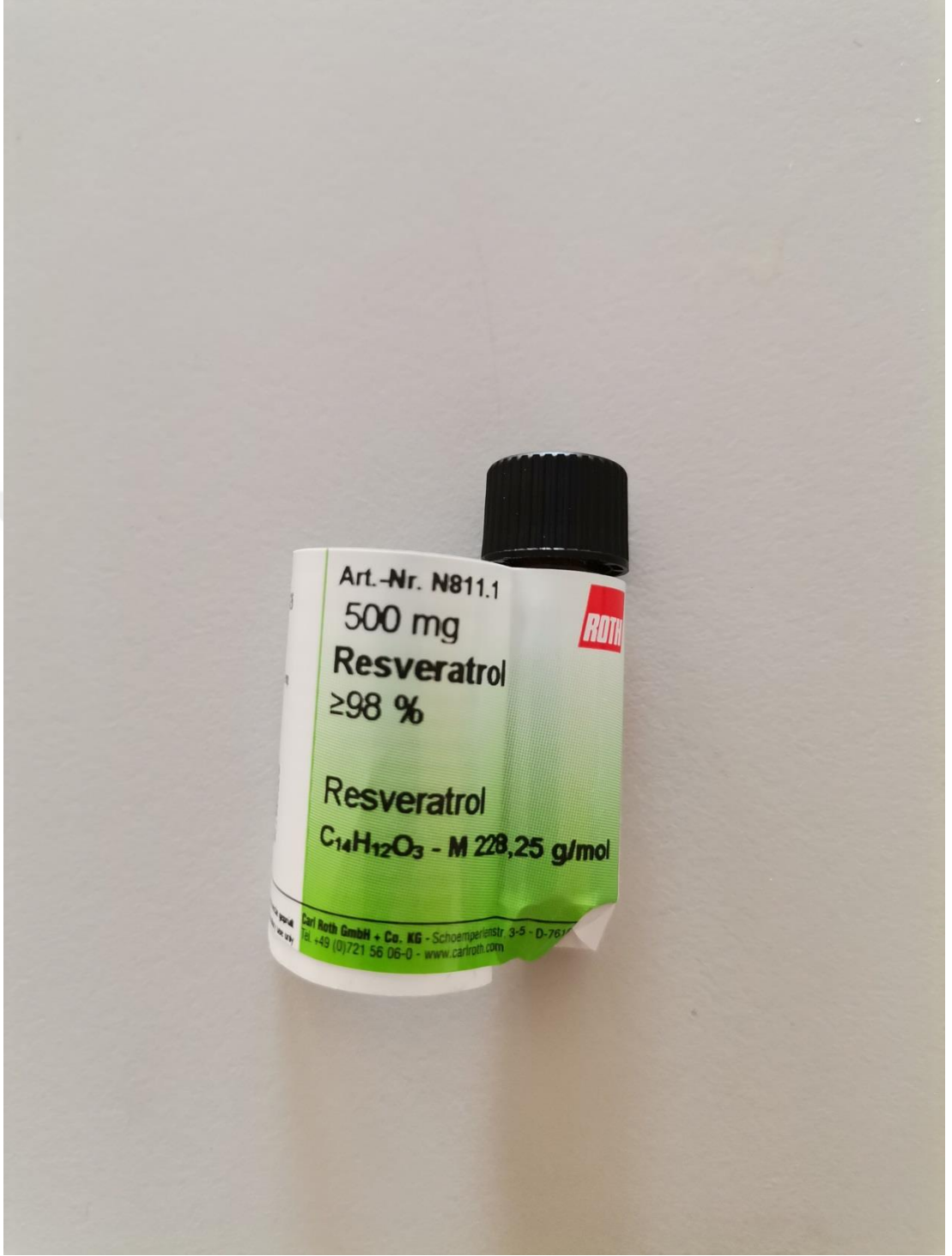
Grup 1 (Kontrol grubu, n=7) : Herhangi bir işlem yapılmayan grup

Grup 2 (İskemi grubu, n=7) : İskemiden sonra ilaç verilmeyen grup

Grup 3 (İskemi + Urapidil grubu, n=7) : İskemi oluşturulduktan sonra reperfüzyondan hemen önce ve reperfüzyondan sonra 3 gün boyunca 5 mg/kg/gün dozunda urapidil (i.p.) verilen grup

Grup 4 (İskemi + Resveratrol grubu, n=7) : İskemi oluşturulduktan sonra reperfüzyondan önce ve reperfüzyondan sonraki 3 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda resveratrol (i.p.) verilen grup

Grup 5 (İskemi + Resveratrol + Urapidil grubu, n=7) : İskemiden sonra reperfüzyondan önce ve reperfüzyon sonrası 3 gün boyunca 30 mg/kg/gün dozunda resveratrol (i.p.) ve 5mg/kg/gün dozunda urapidil (i.p.) kombine tedavi verildi.



Resim 1. Çalışmamızda kullandığımız resveratrol



Resim 2. Çalışmamızda kullandığımız Urapidil

3.2. Anestezi

İşlem öncesi en az 4 saat oral alımları durdurulan ratlara 80 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®; Pfizer, İstanbul, Türkiye) + 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun®; Bayer Healthcare, Leverkusen, Almanya) ile anestezi uygulandı. Anesteziden sonra 50 mg/kg dozunda sefazolin (i.m.) yapıldı. Ayrıca 5 cc salin intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.3. Cerrahi İşlem

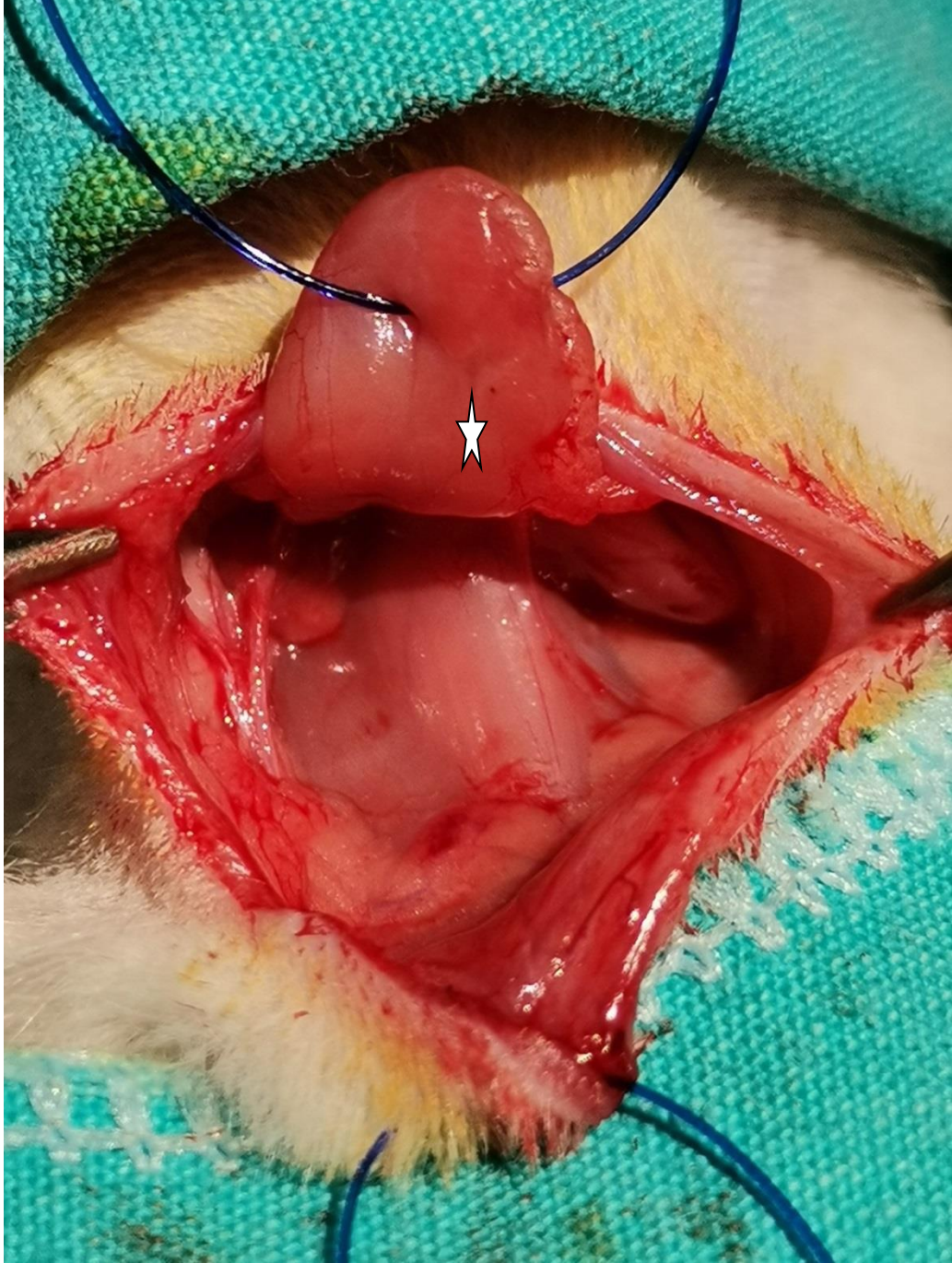
Cerrahi işleme başlamadan önce ratların boyun kısmı traş edildi. İşlemden önce ve cerrahi kapatmadan sonra cerrahi alan %10'luk povidone iodine (Batticon®;

Adeka, Samsun, Türkiye) ile temizlendikten sonra steril gazlı bezle cerrahi alan silindi. Cerrahi alan boyandıktan sonra steril delikli yeşille örtüldü (Resim 3).



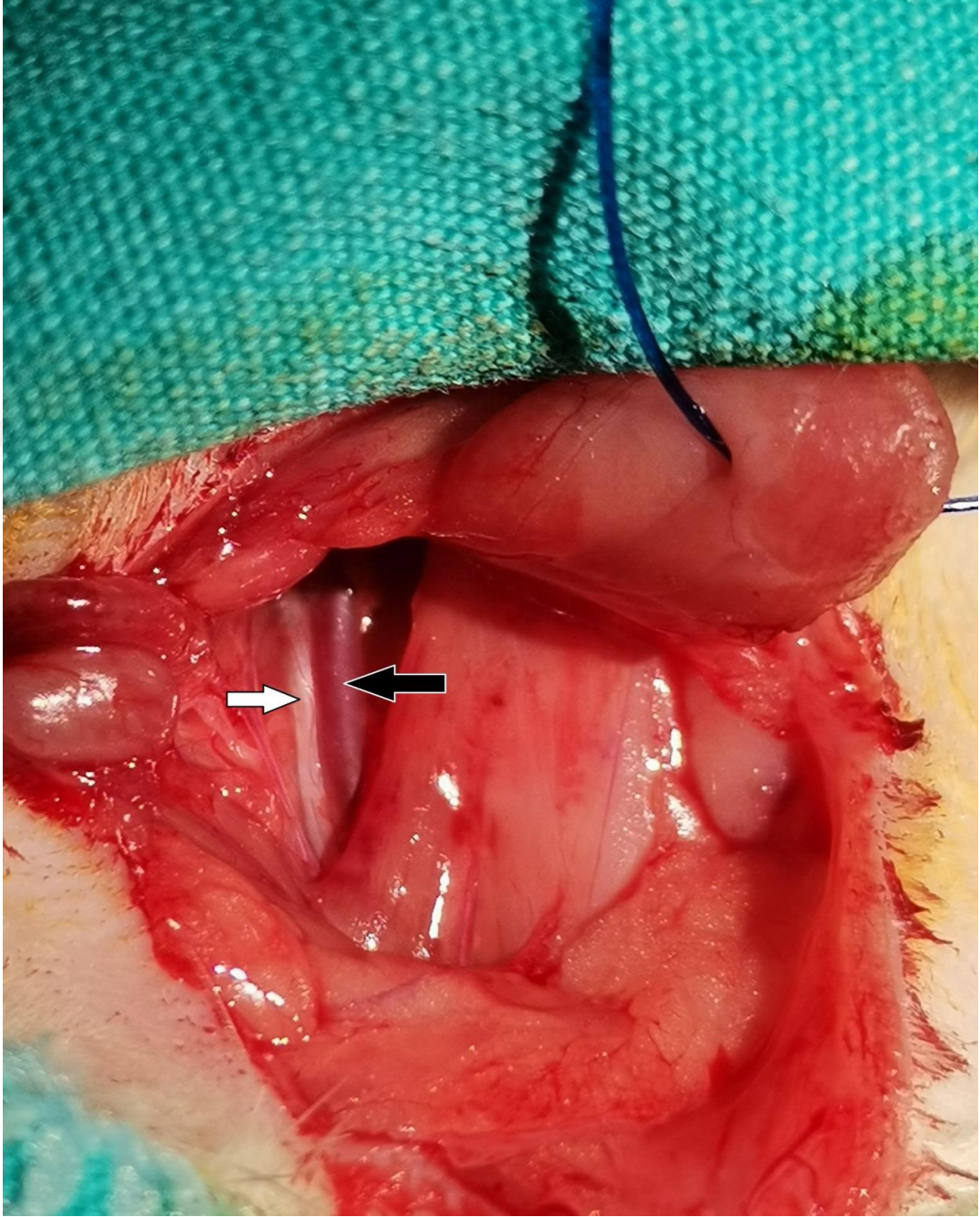
Resim 3. Alanın batikonla boyandıktan sonra izotonikle yıkanması ve steril yeşille örtülmesi. Transvers cilt insizyonu

Transvers insizyonla cilt, cilt altı dokusu geçildikten sonra yüzeysel fasya dokusu geçildi. Yüzeysel fasya geçildikten sonra glandüler doku ve sternohyoid, digastrik, sternomastoid kaslar ortaya çıkarıldı (Resim 4).



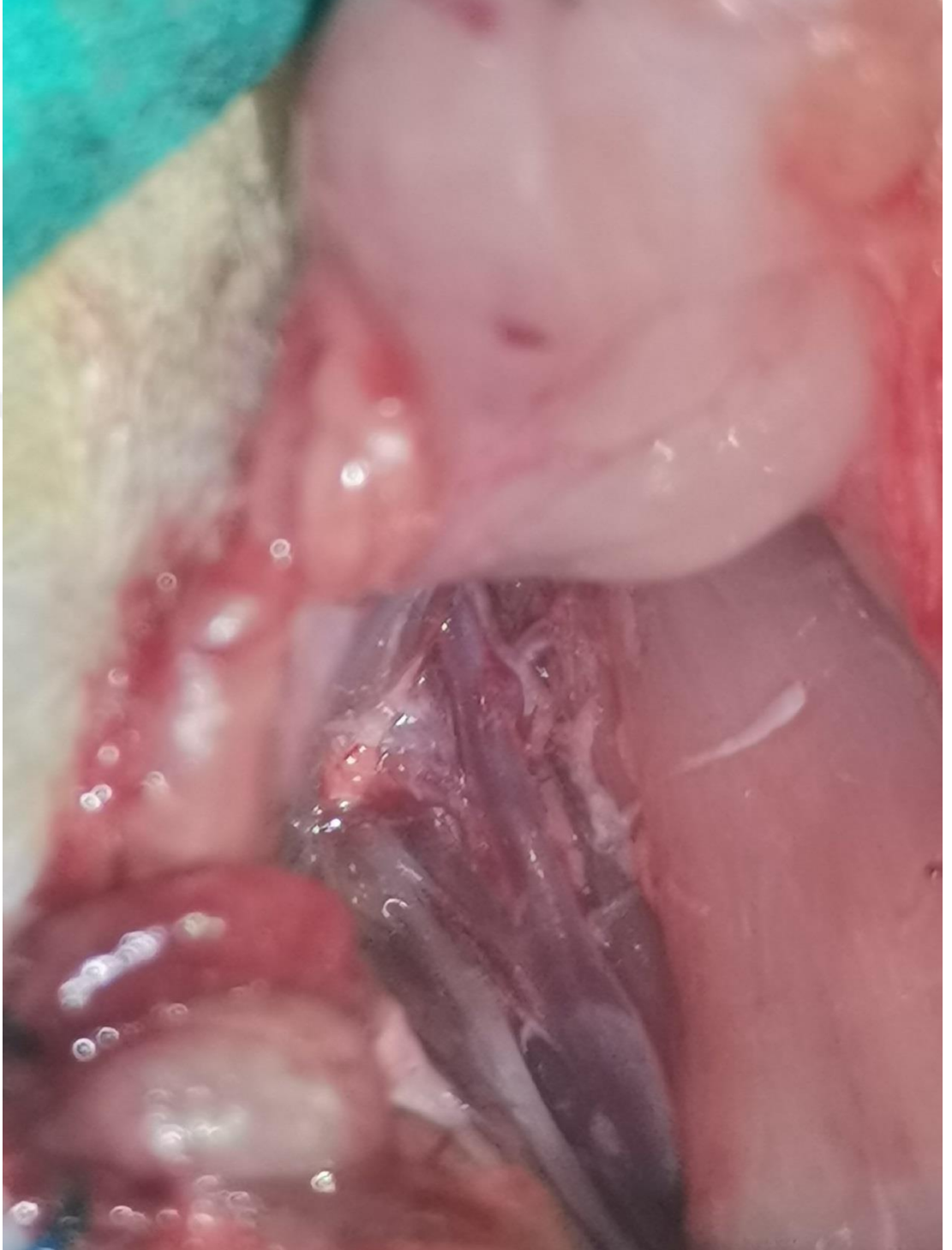
Resim 4. Glandüler doku, sternohyoid kas ve sternomastoid kasın görüntüsü

Künt disseksiyonla damar-sinir paketine ulaşıldı. Burada karotis kommunis ve nervus vagus ortaya konuldu (Resim 5).



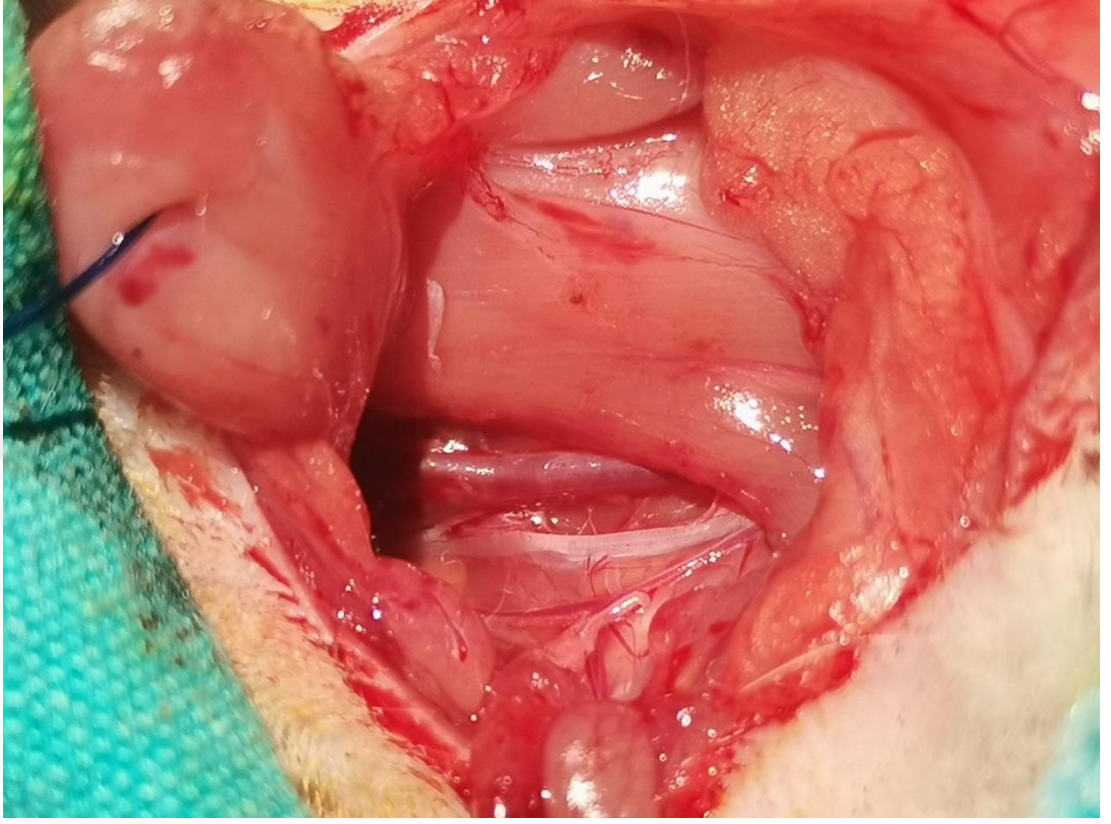
Resim 5. beyaz ok: nervus vagus siyah ok: karotis kommunis

Karotis kommunis takip edilerek bifurkasyona ulaşıldı ve internal ve external karotid arterler ortaya konuldu (Resim 6).



Resim 6. Karotis kommunis takip edilerek karotis externa ve intern ortaya konuldu.

Nervus vagus keskin disseksiyonla karotis kommunisten disseke edildi
(Resim 7).



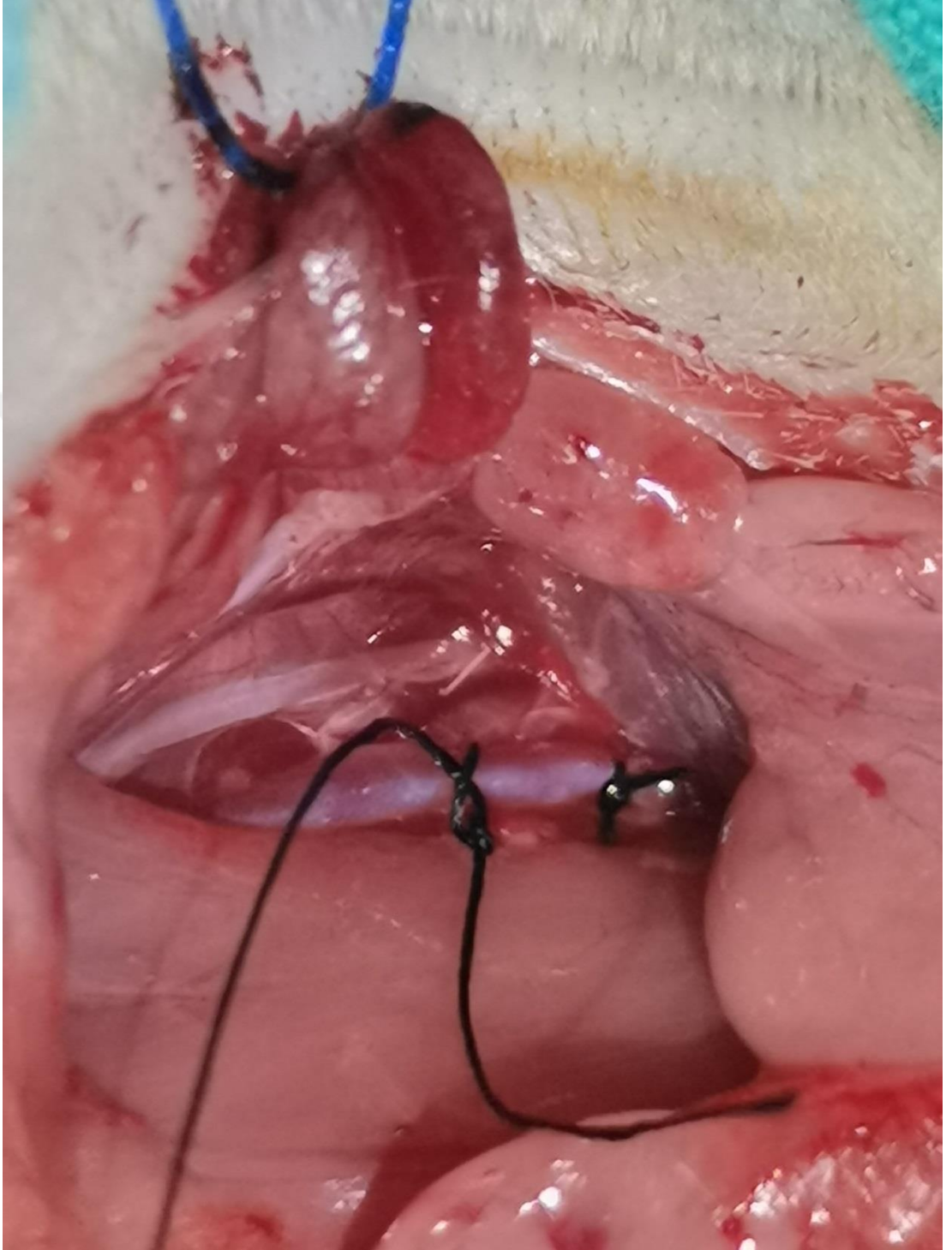
Resim 7. Nervus vagus görüntüsü

External karotid karter distalde 5-0 ipek sturla sıkı bir şekilde baēlandı (Resim 8).



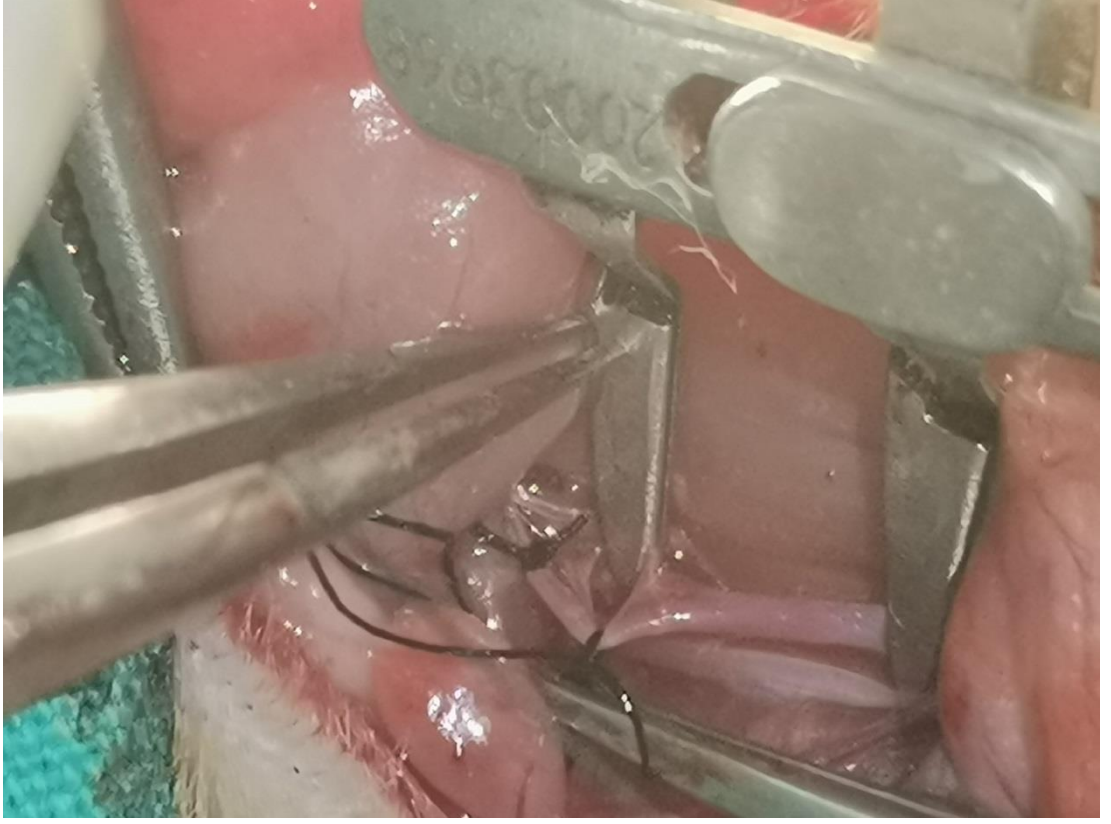
Resim 8. External karotid arterin distalden sıkıca baēlanması

Diğer suture ise external karotid arterin karotis kommunisten dallandığı yere yakın bir şekilde gevşek olarak bağlandı (Resim 9).



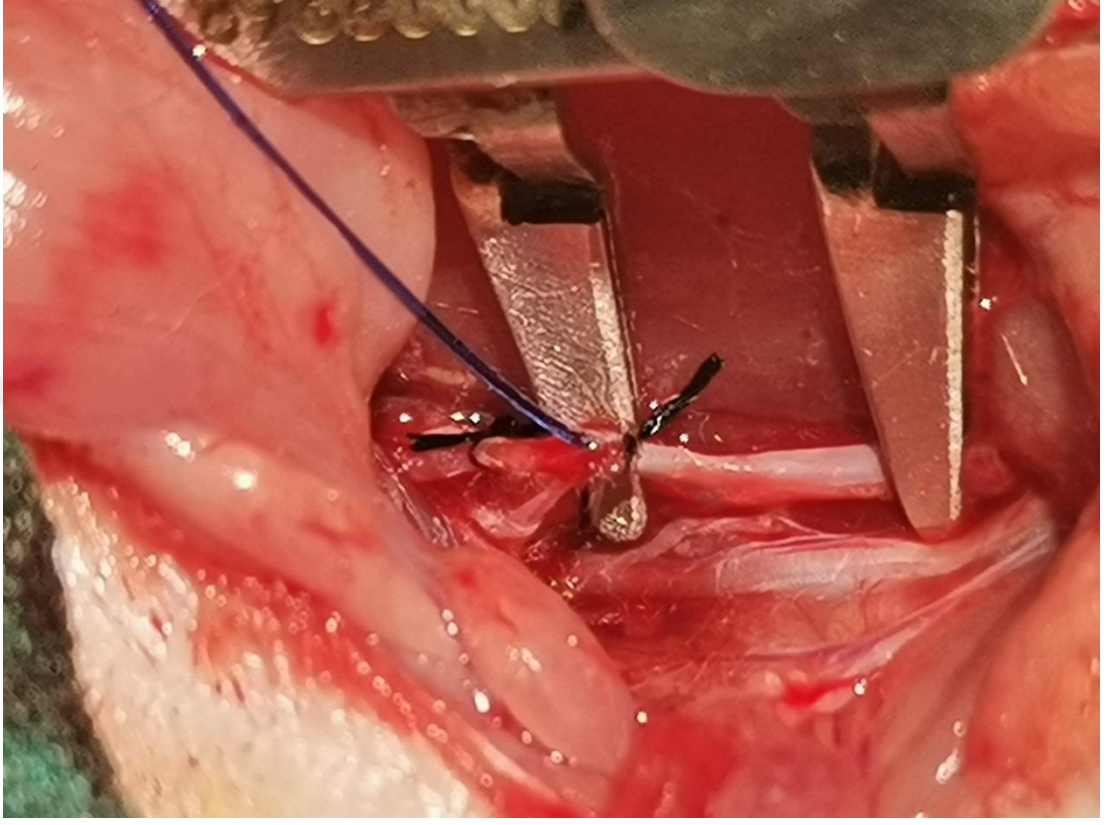
Resim 9. External karotid arterin bifurkasyona yakın yerden gevşek bağlanması.

Karotis kommunis ve internal karotid arter geçici klipsler yardımıyla geçici olarak kapatıldı (Resim 10).



Resim 10. Karotis kommunis ve karotis internanın klipslerle geçici olarak kapatılması

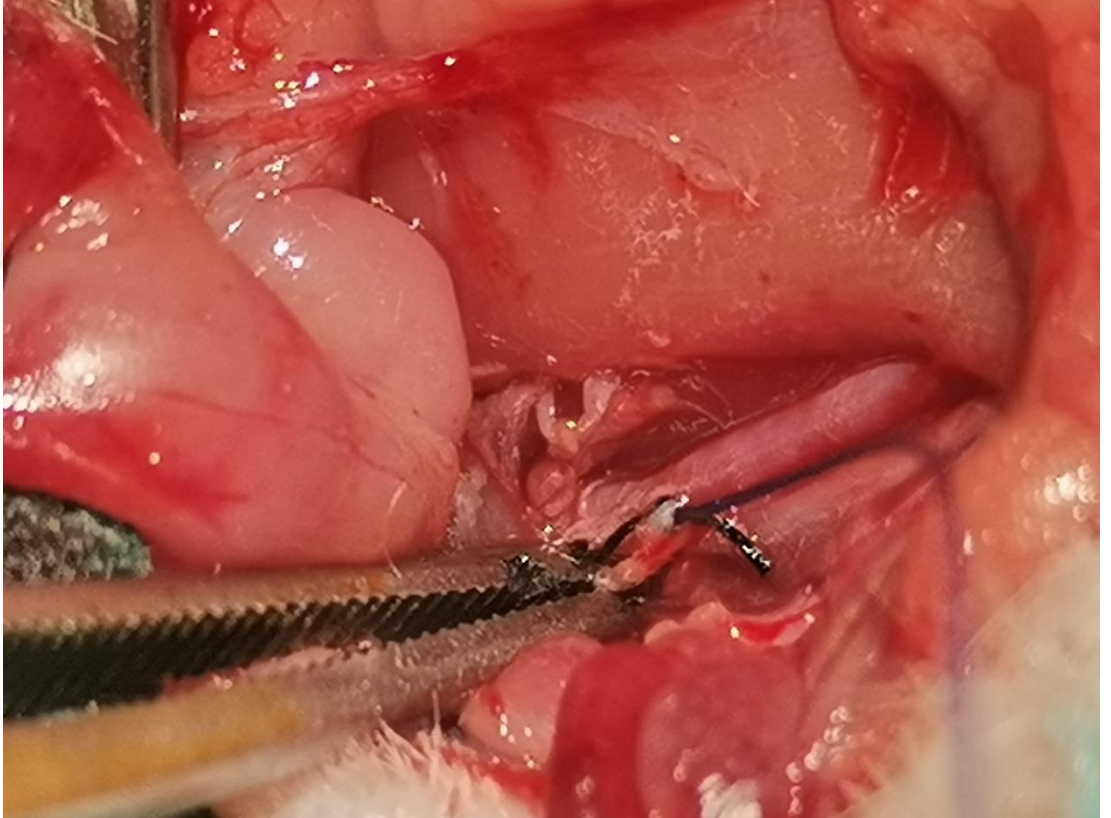
External karotid arterlereki süturlar arasında arteriotomi yapıldı. Buradan ucu genişletilmiş 3-0 monoproten sütur geçirildi ve sütür karotis kommunise kadar ilerletildi(Resim11).



Resim 11. Arteriotomi yapılan external karotid arterden sturum ilerletilmesi

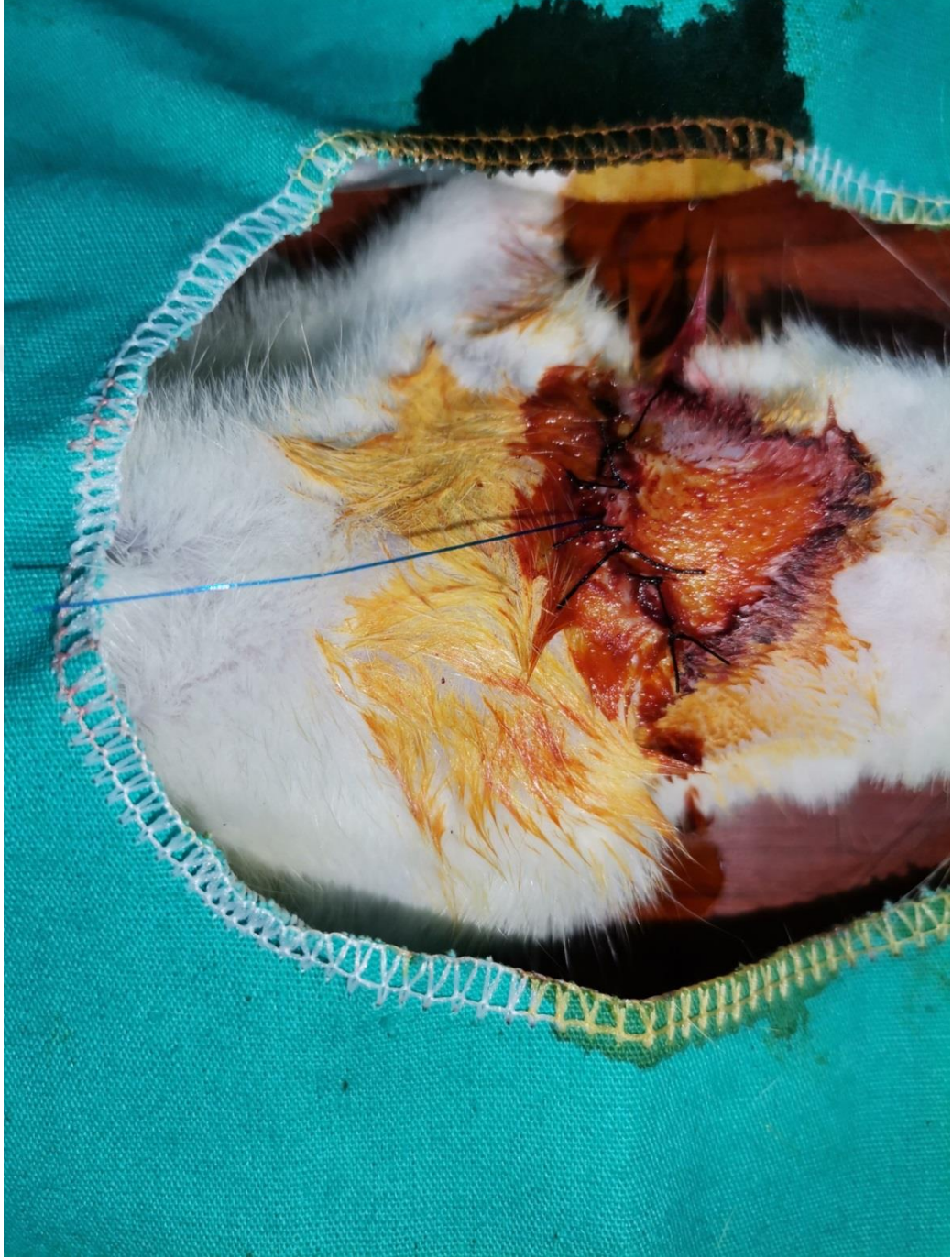
Sütür karotis kommunise ilerletildikten sonra gevşek bırakılan sütür sıkıca bağlandı.

Karotis kommunise ilerletilen sütür manevrayla internal karotid artere doğru yönlendirildi ve klipsler çıkarıldıktan sonra sütür internal karotis içinde ilerletildi(Resim12).



Resim 12. Karotis kommunis, karotis internanın görünümü; external karotidten sütürün internal karotide doğru yönlendirilmesi

Suturda direnç hissedilene kadar ilerletildi. 2 saat boyunca sütür internal karotid arterde bekletilip MCA oklüzyonu sağlamış olduk. Tabakalar usulüne uygun bir şekilde 3-0 ipek sütürle kapatıldı (resim 13).



Resim 13. Tabakaların   s  l  ne uygun kapatılması

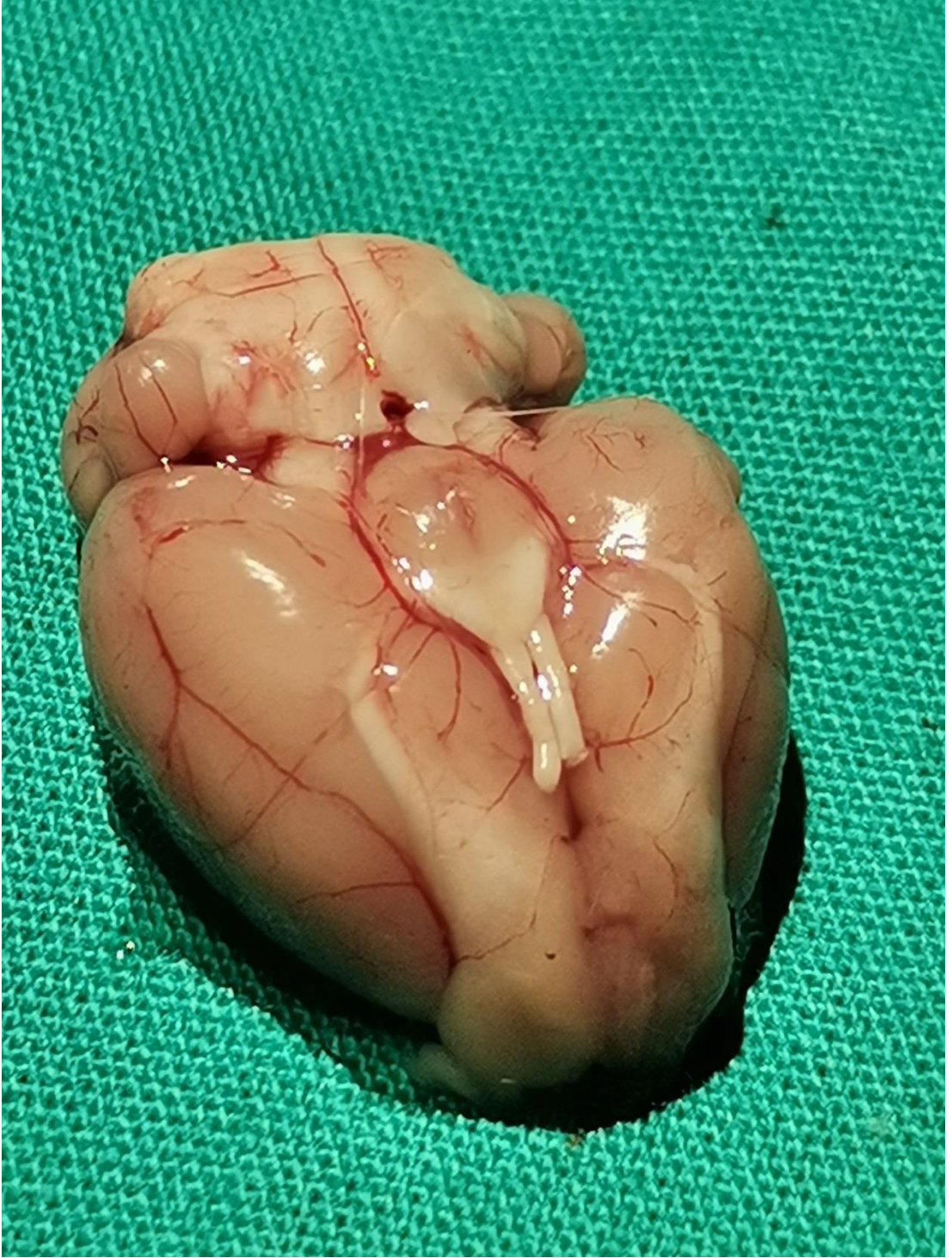
Cerrahi alan batikonla temizlendi. 2 saat sonunda sütur geri çekilerek reperfüzyon sağlandı.

3.4. Sakrifikasyon

Cerrahi işlemden 72 sonra tedavileri tamamlanan gruplarla (grup 3,4,5) kontrol (grup 1) ve iskemi (grup 2) gruplarının sakrifikasyon işlemine geçildi. Genel anestezi uygulanan ratlara (80 mg/kg ketamin hidroklorid + 10 mg/kg ksilazin hidroklorid) sakrifikasyon işleminden önce sol ventrikllerinden kan alındı. Daha sonra boyun kasları disseke edilerek foramen magnuma girildi. Buradan keskin makasla kafatası orta hattan oksipitalden frontale doğru kesildi. Mikrodissektr ve mikromakas yardımıyla beyin dokusu kraiyumdan çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokusu orta hattan ikiye bölündü. İskemi oluşturduğumuz sağ hemisferler %10 ‘luk formaldehit içerisinde oda sıcaklığında fikse edildi.



Resim 14. Rat beyninin yandan görüntüsü



Resim 15. Rat beyninin bazal görüntüsü

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Rutin Histolojik Takip

Sakrifiye edilen hayvanların beyin doku örnekleri iki hemisfere ayrıldıktan sonra %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak 48 saat süreyle fiksasyon gerçekleştirildi. Fikse edilen beyin doku örnekleri bir gece süreyle akar çeşme suyu altında yıkandı ve formol uzaklaştırıldı. Daha sonra sudan alınan örnekler artan alkol serilerinde (%70, %80, %90, %96, %100) birer saat süreyle bekletilerek dehidratasyon gerçekleştirildi. Doku örnekleri iki seri ksilenle bekletilerek şeffaflandırma gerçekleştirildi. Şeffaflandırma işleminde ksilenin dokuya nüfuzu gözle izlenerek takip edildi. Ksilen şeffaflandırmasından sonra örnekler %50 ksilen içeren erimiş parafin içerisinde inkübatörde 1 saat süreyle bekletildi. Kirli parafin uzaklaştırıldı ve örnekler 2 saat süreyle daha temiz erimiş parafinde bekletilerek parafin infiltrasyonu gerçekleştirildi. Örnekler daha sonra parafin bloklara gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler 56 °C sıcaklığa ayarlı su banyosuna bırakıldı, pozitif şarjlı lamlara alındı. Örnekler daha sonra suyun uzaklaştırılması ve parafin depolimerizasyonu için 56 °C sıcaklık ayarlı inkübatörde iki saat süreyle bekletildi. Daha sonra kesitler boyamalar yapılmak üzere uygun ortamlara alınarak muhafaza edildi.

4.2. Hematoksilen ve Eozin boyama Protokolü

Rutin histopatolojik inceleme amacıyla gruplardan alınan beyin dokularına ait kesitler hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Bu amaçla iki seri ksilen içerisinde 15'er dakika bekletilen kesitler azalan alkol serilerinde (%100, %96, %90, %80, %70) 5'er dakika süreyle bekletildi ve kesitler distile suya bırakıldı. Daha sonra Mayer Hematoksilen ile örnekler 6 dakika süreyle boyandı. Süre sonunda çeşme altında 5 dakika yıkanan örnekler %1'lik asit alkole daldırıp çıkartıldı ve çeşme suyunda tekrar yıkamaya alındı. Hematoksilen boyanan örnekler alkolik eozin solüsyonuna alındı ve 3 dakika süreyle boyama gerçekleştirildi. Eozin boyama süresi sonunda örnekler artan düşük alkol serilerinde (%70, %80, %90, %96) daldır çıkart ile fazla eozin boyasından arındırıldı. Absolu ethanole alınan kesitler bir dakika

süreyle bekletildi. Kesitler daha sonra iki seri ksilen içerisinde 15'er dakika bekletildi ve entellan ile kapatılarak daha sonra incelenmek üzere kaldırıldı.

4.3. İmmunohistokimya Protokolü

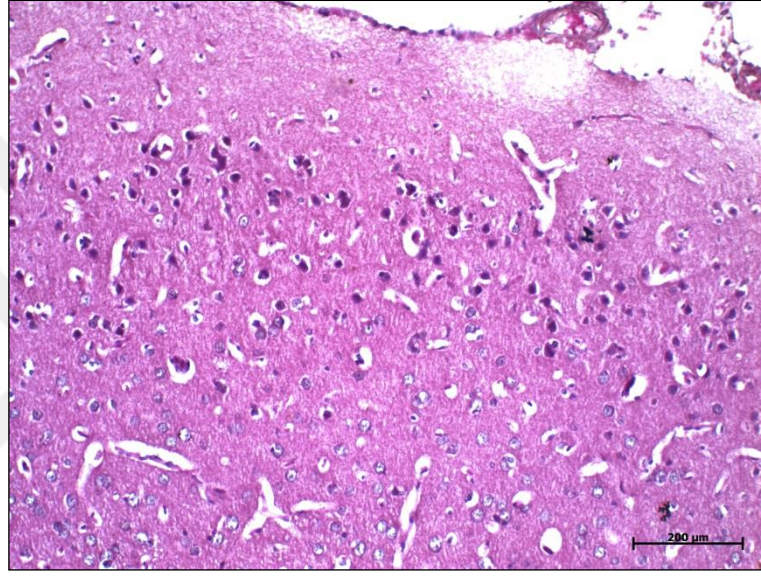
Parafin bloklara gömülüp kesit alınan gruplara ait beyin örneklerinde immunohistokimyasal olarak Kaspaz 3, Bcl-2 ve TNF α immunohistokimya gerçekleştirildi. Bu amaçla pozitif şarjlarda bulunan doku kesitleri iki seri ksilende 15'er dakika ve azalan alkol serilerinde (%100, %96, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildikten sonra distile suda bekletildi ve immunohistokimya için örnekler üç seri tamponlanmış fosfat buffer (PBS) içerisinde alınarak 5'er dakika süreyle yıkandı. Kesitler daha sonra citrat buffer içerisinde alındı ve kaynama derecesine kadar ısıya maruz bırakıldı. Isınan sitrat buffer içerisindeki örnekler oda ısısına gelinceye kadar bekletildi ve üç seri PBS içerisinde 5'er dakika yıkama yapıldı. Peroksidaz aktivasyon inhibisyonu için örnekler %3'lük H₂O₂ çözeltisinde 15 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra üç seri PBS te yıkanan örnklerdeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile sınırlandırıldı ve örneklerin üzerine Ultra V Block (TA-125-UB, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) damlatılarak 7 dakika süreyle oda ısısında inkübasyon yapıldı. Bloklama sonra örneklerin üzerine sırasıyla 1:200, 1:100, 1:250 oranda dilüe edilen Kaspaz 3 (sc56053, Santa cruz Dallas, TX, ABD), Bcl-2 (sc7382, Santa cruz Dallas, TX, ABD), ve TNF α (sc-1348, Santa cruz Dallas, TX, ABD) antikorları damlatılarak gece boyunca + 4 °C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Antikorları uzaklaştırılan kesitler üç seri PBS'te 5'er dakika süreyle yıkandıktan sonra kesitlerin üzerine geniş spektrumlu sekonder antikor Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (TP-060-BN, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) damlatıldı ve 15dakika süreyle oda ısısında inkübasyon yapıldı. Daha sonra örnekler üç seri PBS içerisinde 5'er dakika süreyle yıkandı ve örneklerin üzerine Streptavidin Peroksidaz (TS-125-HR, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) damlatılarak 15 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı. Antikorların tespiti için üç seri PBS'te 5'er dakika yıkanan örneklerin üzerine DAB kromojen(12683957, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) damlatılarak reaksiyon gelişmesi ışık mikroskobunda izlendi. Daha sonra çeşme suyunda yıkanan örnekler 1 dakika süreyle hematoksilen ile zıt boyama yapıldı, artan alkol serilerinde (%70, %80, %90, %96, %100) 5'er dakika bekletilip

iki seri ksilende 15'er dakika süreyle şeffaflandırıldı ve entallan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi ve mikrografları alındı.

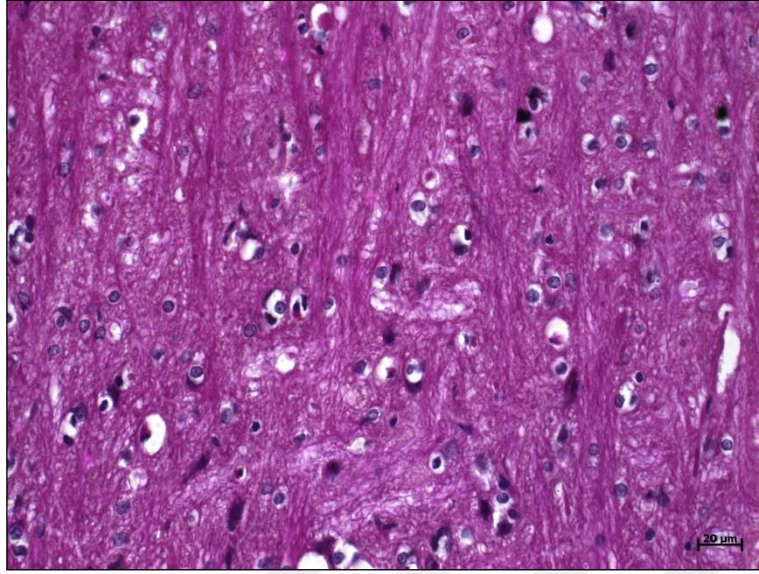
5. BULGULAR

5.1. Histopatolojik Değerlendirmeler

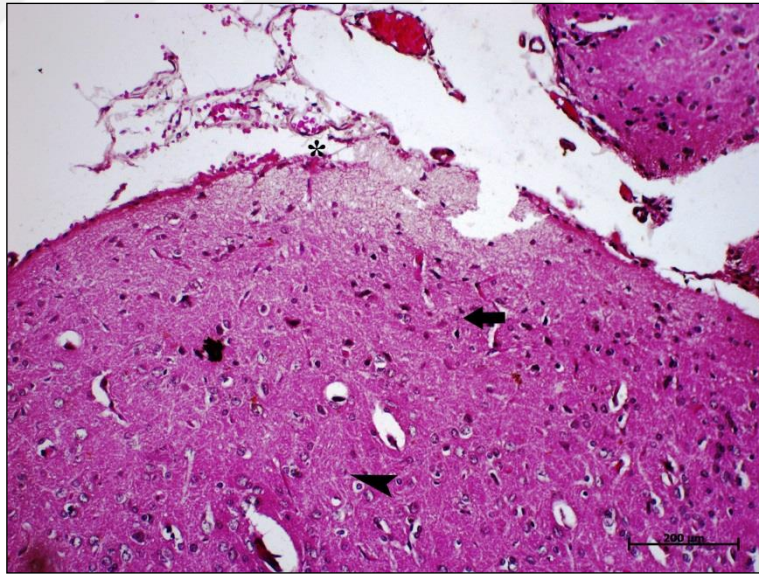
5.1.1. Hematoksilen&Eosin Bulguları



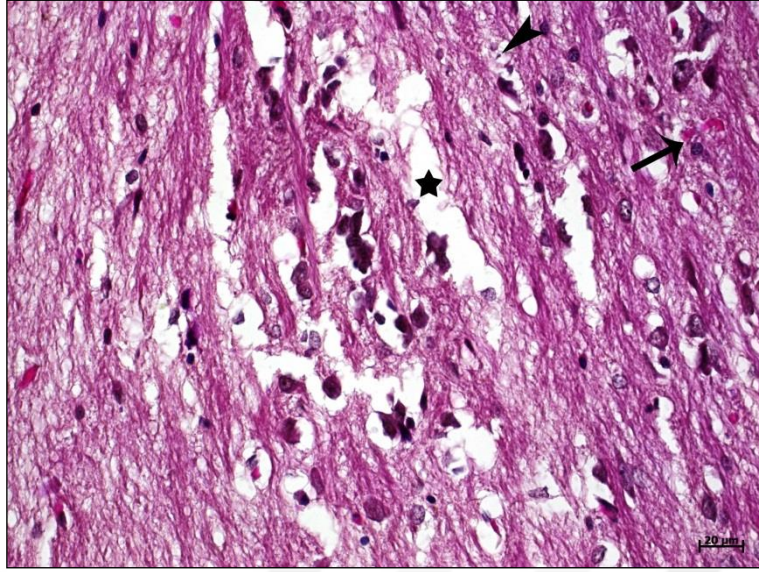
Figür 1: Kontrol grubu beyin korteksine ait kesit. Normal görünen nöronlar, nöroglialar ve serebral korteks izlendi. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 200 µm.



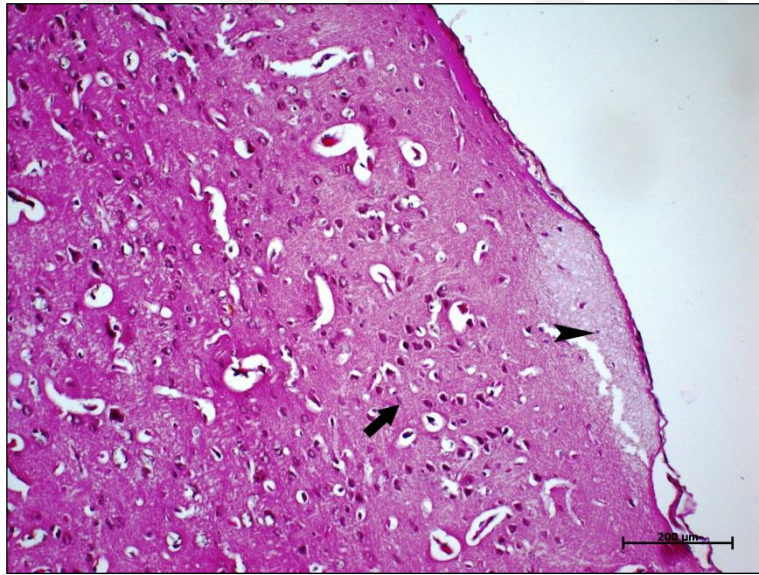
Figür 2: Kontrol grubu substansiya albaya ait kesit. Kesitte düzenli tertiplenmiş sinir lifleri ve nöroglialar izlenmektedir. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 20 µm.



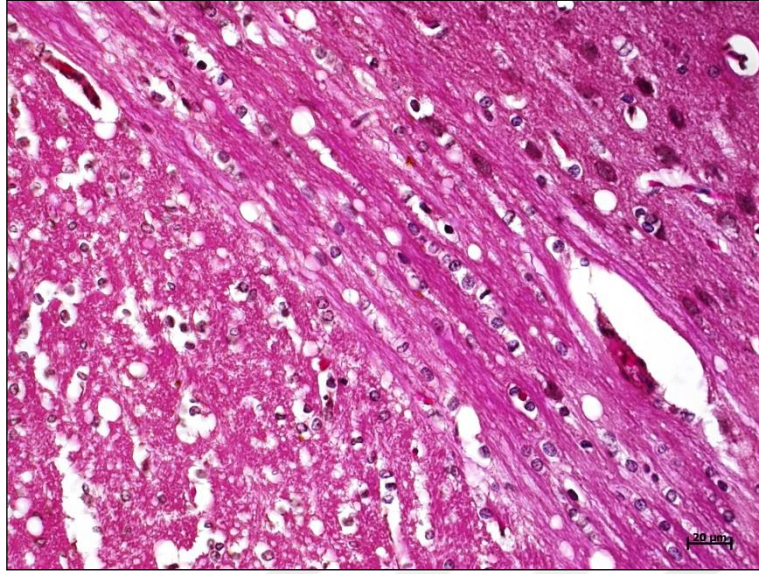
Figür 3: İskemi grubu beyin korteksine ait kesit. Subaraknoid hemoraji alanları (*), nöronlarda (kalın ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) piknotik çekirdeklerin yoğun dağılım gösterdiği ayrıca dokuda yer yer ödemli alanların bulunduğu görüldü. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 200 µm.



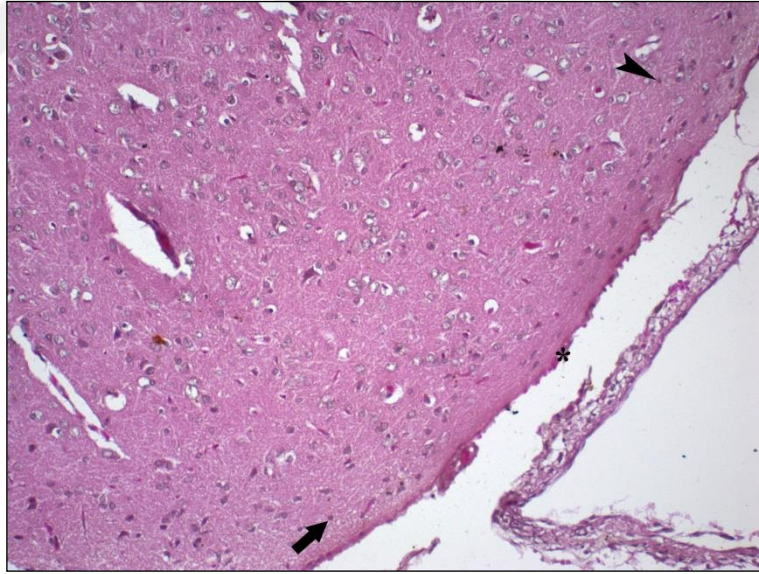
Figür 4: İskemi grubu substansiya albaya ait kesit. Ak maddede kan dokusu elemanlarının sinir lifleri arasında serbest halde bulunduğu (ok) ayrıca nörogliaların düzensiz hücre görüntüsünün yanı sıra nükleuslarda piknozis (ok başı) ve sinir lifleri arasında ödem (yıldız) oldukça yaygındı. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 20 µm.



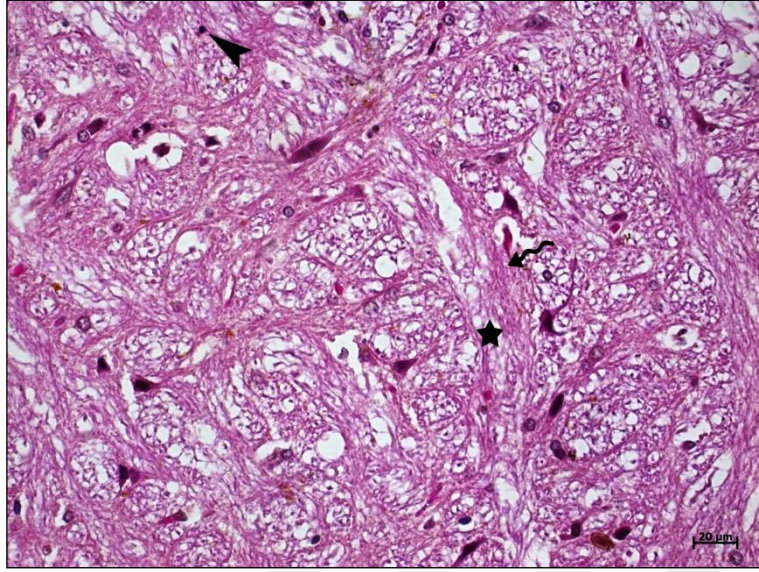
Figür 5: Resveratrol grubu beyin korteksine ait kesit. Bu gruptaki beyin korteksinde, nöron (kalın ok) ve glial hücrelerde (ok başı) yer yer izlenen piknotik çekirdek görüntüsüne rağmen dokunun genelinde kontrol grubuna yakın bir morfolojik görüntü izlendi. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 200 µm.



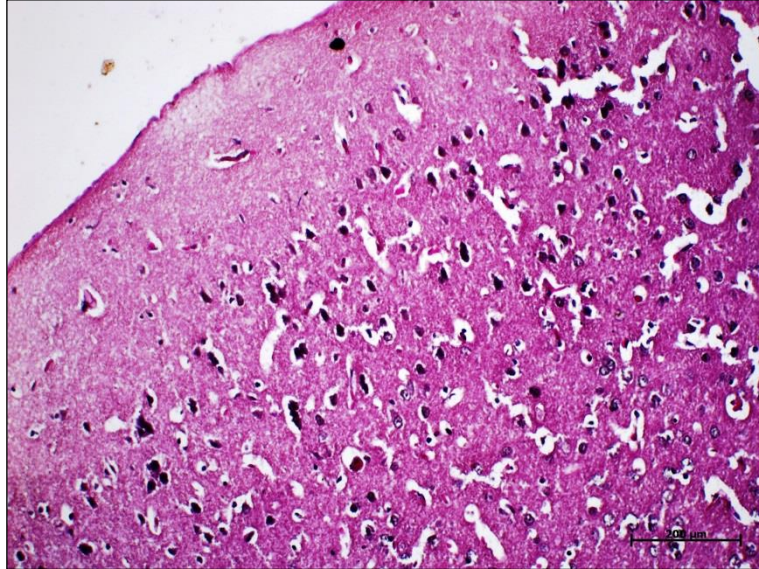
Figür 6: Resveratrol grubu substansiya albaya ait kesit. Bu grubun sinir liflerinin iskemi grubuna göre daha düzenli bir görüntüde olduğu ve kontrol grubuna benzer morfolojik yapının varlığı görüldü. Nöroglialar yine genel olarak kontrol grubuna benzer şekildeydi **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 20 μm .



Figür 7: Urapidil grubu beyin korteksine ait kesit. İskemi grubuyla karşılaştırıldığında subaraknoid kanama alanları (*) ve kan dokusunun yer yer beyin dokusuna göçünün azaldığı görüldü. Ayrıca nöron (kalın ok) ve nöroglialarda (ok başı) gözlenen piknotik çekirdekli hücreler miktarında belirgin bir azalma izlendi. Bu grupta morfolojinin iskemi grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubuna yakın bir görüntüye sahip olduğu görüldü. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 200 μm .

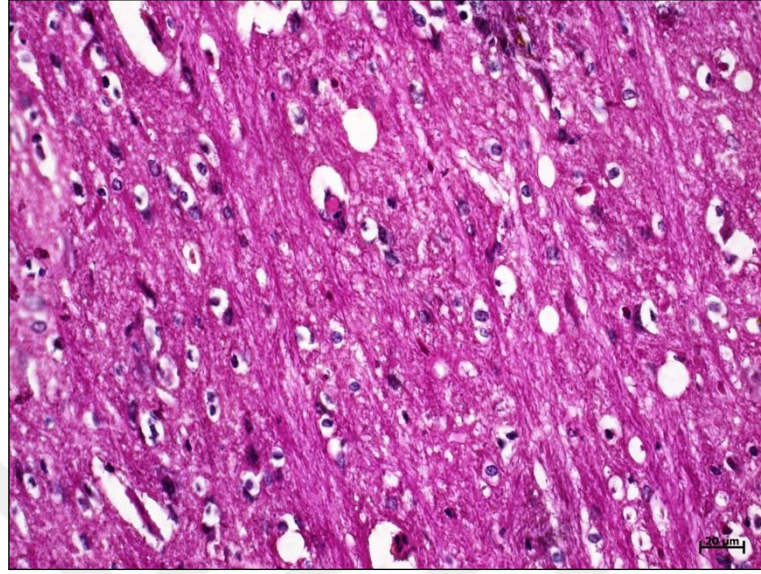


Figür 8: Urapidil grubu substansiya albaya ait kesit. Sinir lifleri arasındaki ödemin iskemi grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalma gösterdiği görüldü. Sinir liflerindeki fokal düzensizlik (kırımlı ok) ve ödem (yıldız) yanı sıra yer yer izlenen nöroglialardaki dejenerasyona (ok başı) rağmen genel morfolojinin kontrol grubuna daha yakın bir görüntüye sahip olduğu görüldü. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 20 µm.



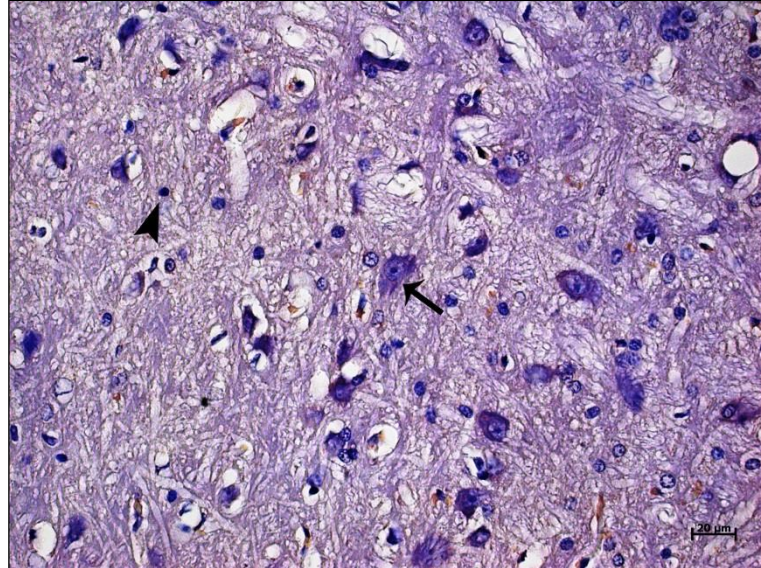
Figür 9: Resveratrol + Urapidil grubu beyin korteksine ait kesit. Subaraknoid kanama izlerinin neredeyse tamamen ortadan kalktığı, beyin dokusuna geçen kan doku hücrelerinin büyük oranda ortadan kalktığı görüldü. Buna karşın bu grubun örneklerinde nöron ve nöroglialarda yer yer gözlenen piknotik çekirdekli hücreler haricinde iskemi grubuyla

karşılaştırıldığında hücrelerin ve morfolojinin kontrol grubuna oldukça benzer bir görüntüye sahip olduğu görüldü. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 200 µm.

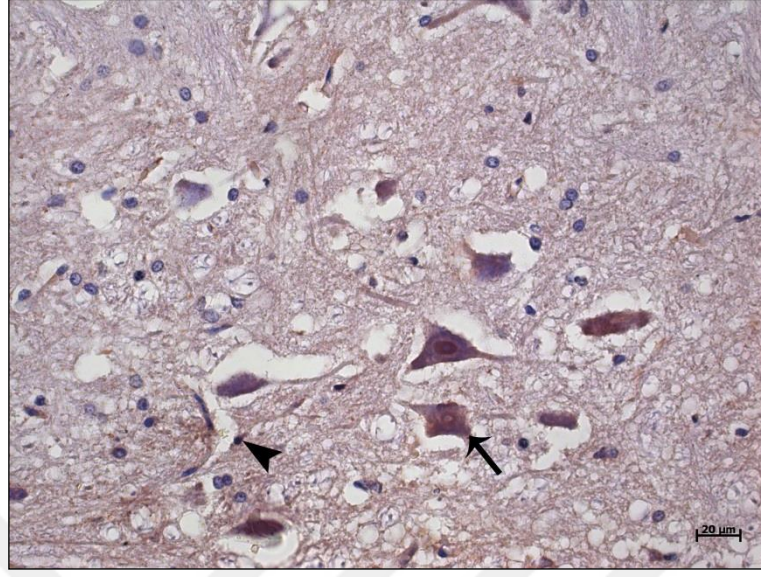


Figür 10: Resveratrol + Urapidil grubu substansiya albaya ait kesit. Bu grubun ak maddesinde sinir liflerinin kontrol gibi düzenli bir görüntüye sahip olduğu, sinir lifleri arasındaki ödemin ve dejenere glia hücrelerin tamamen ortadan kalktığı izlendi. **Boyama:** Hematoksilen & eozin, **Bar:** 20 µm.

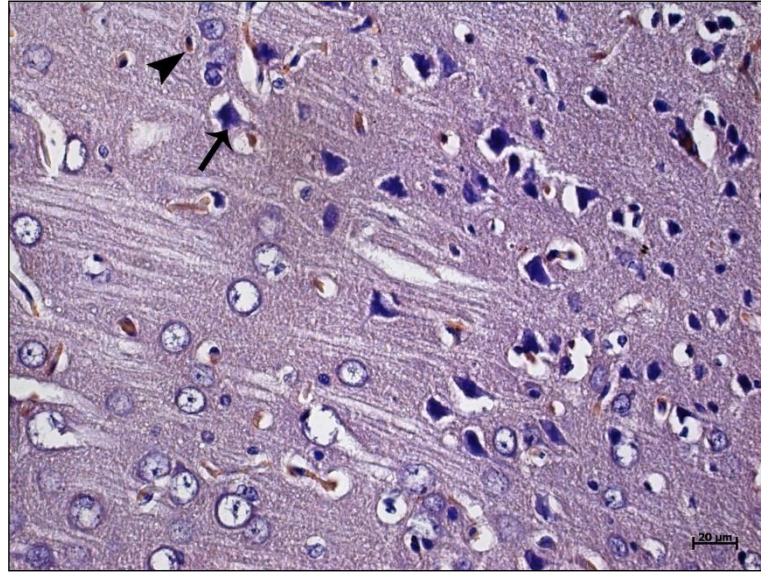
5.1.2 İmmunohistokimyasal Bulgular



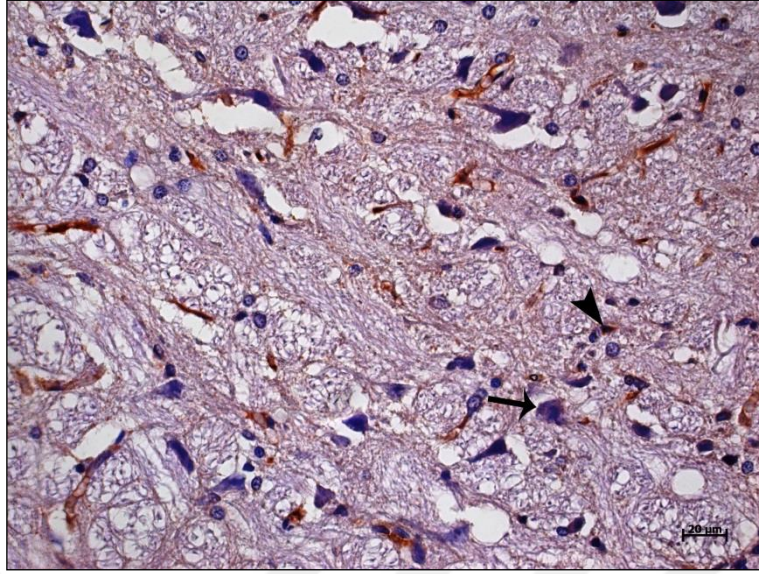
Figür 11: Kontrol grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immünohistokimya. Nöronlarda (ok) ve nöroglialarda (ok başı) oldukça düşük düzeyde kaspaz 3 varlığı izlendi. **Boyama:** Kaspaz 3 immünohistokimya, **Bar:** 20 µm.



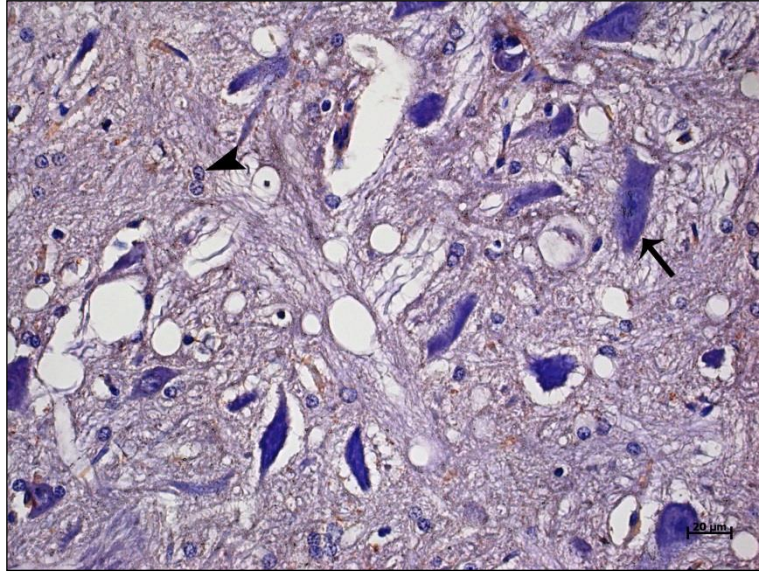
Figür 12: İskemi grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve nöroglialarda (ok başı) çok yoğun kaspaz 3 varlığı izlendi. **Boyama:** Kaspaz 3 immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



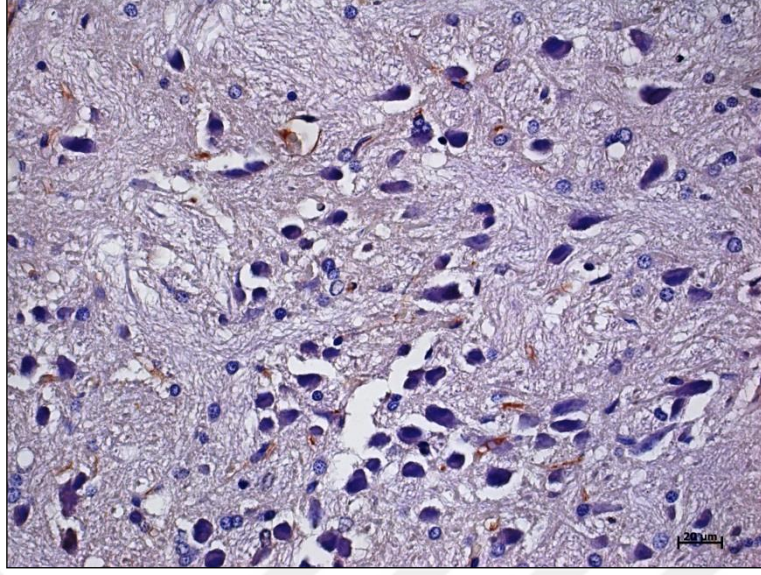
Figür 13: Resveratrol grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve nöroglialarda (ok başı) kaspaz 3 yoğunluğu kontrol grubuna daha yakın bir görüntü gösterdi. **Boyama:** Kaspaz 3 immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



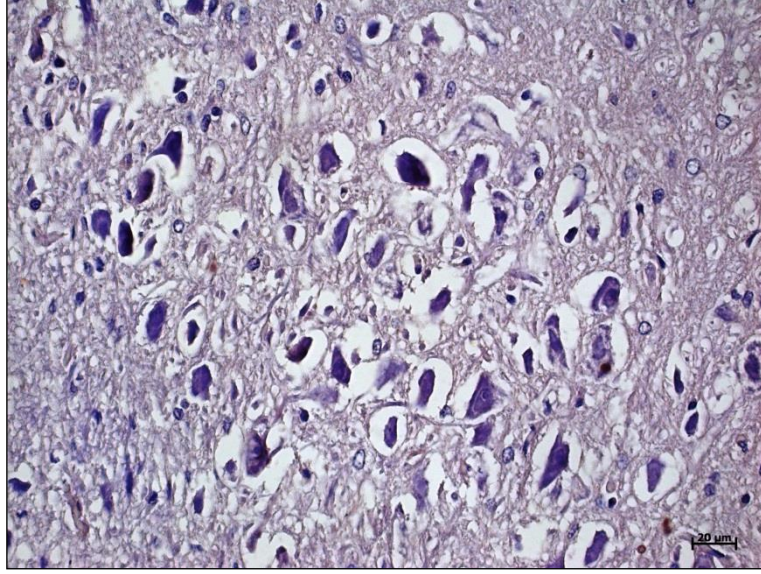
Figür 14: Urapidil grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Bu grupta kaspaz 3 yoğunluğunun iskemi grubuna göre azaldığı ancak fokal alanlarda bazı nöronlarda (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) kaspaz 3 immunopozitifliğinin yoğun olduğu görüldü. **Boyama:** Kaspaz 3 immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



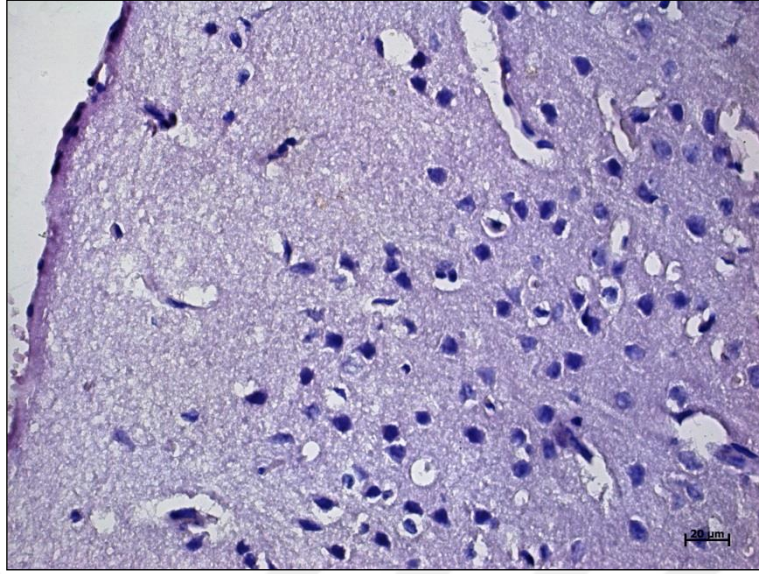
Figür 15: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde kaspaz 3 immunohistokimya. Dokunun genelinde nöronlarda (ok) ve nörogliyalarda (ok başı) kaspaz 3 düzeyinin kontrol grubuna çok yakın olduğu görüldü. **Boyama:** Kaspaz 3 immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



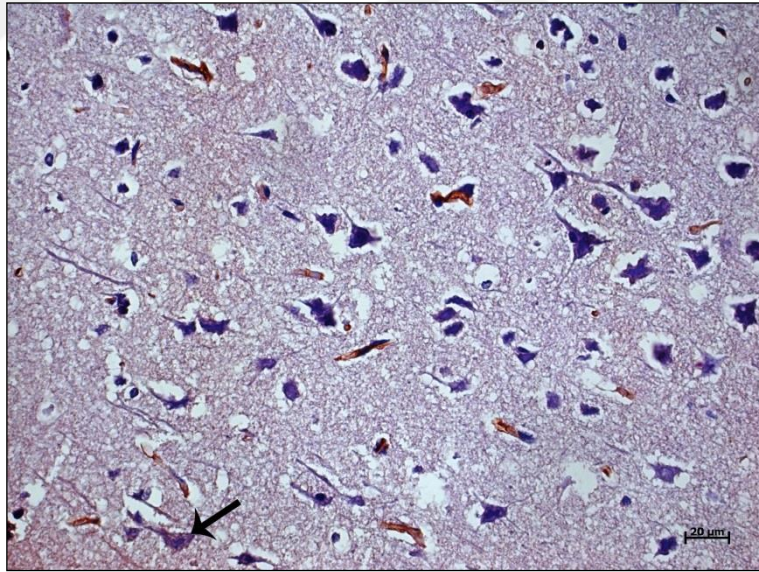
Figür 16: Kontrol grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya. Dokunun genelinde nöronlarda ve nöroglialarda Bcl-2 düzeyinin oldukça düşük olduğu görüldü. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



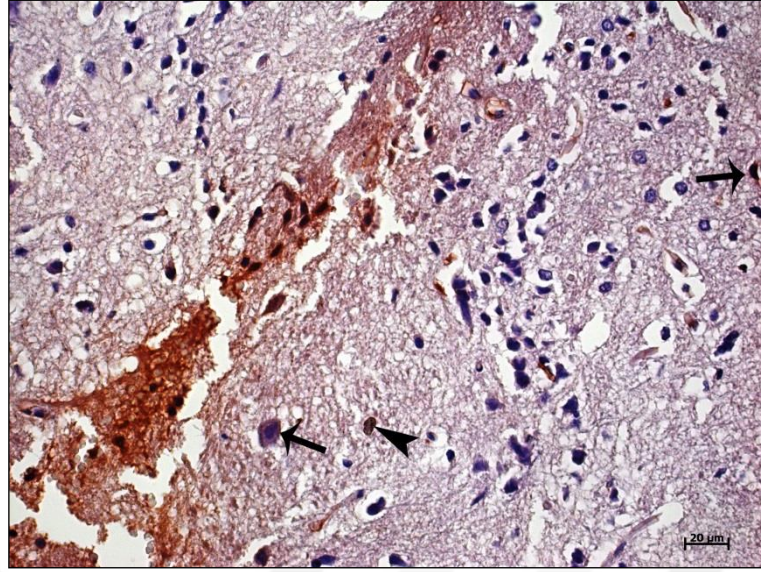
Figür 17: İskemi grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya. Dokunun genelinde Bcl-2 düzeyinin düşük olduğu izlendi. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



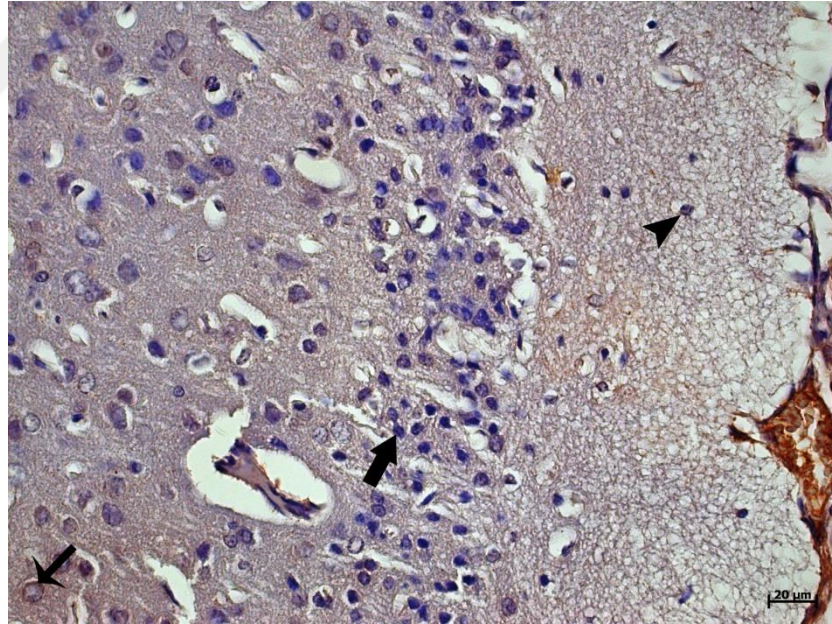
Figür 18: Resveratrol grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya. Resveratrol tedavisi uygulanan hayvanların beyin kesitlerinde Bcl-2 ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu görüldü. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



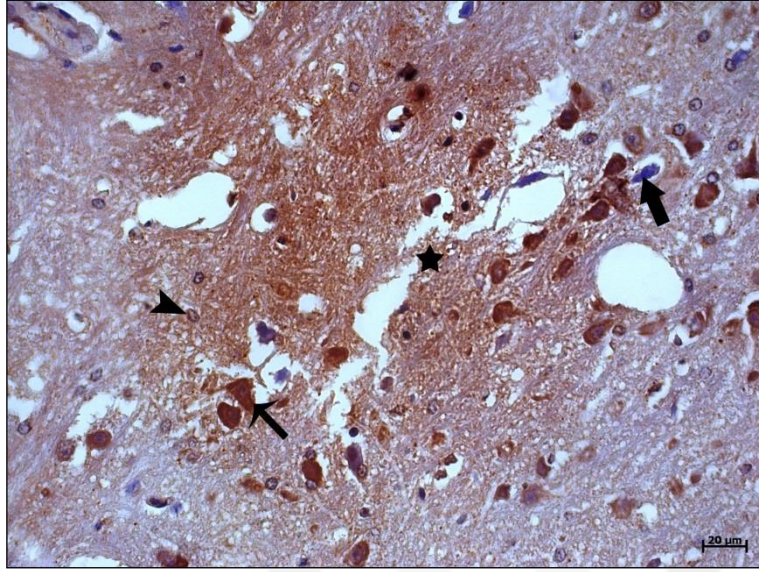
Figür 19: Urapidil grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya. Nöronlarda ve glia hücrelerinde genel olarak Bcl-2 düzeyi oldukça düşük olmasına rağmen bazı nöronlarda (ok) Bcl-2 ekspresyonunun diğer gruplara göre artış eğiliminde olduğu görüldü. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



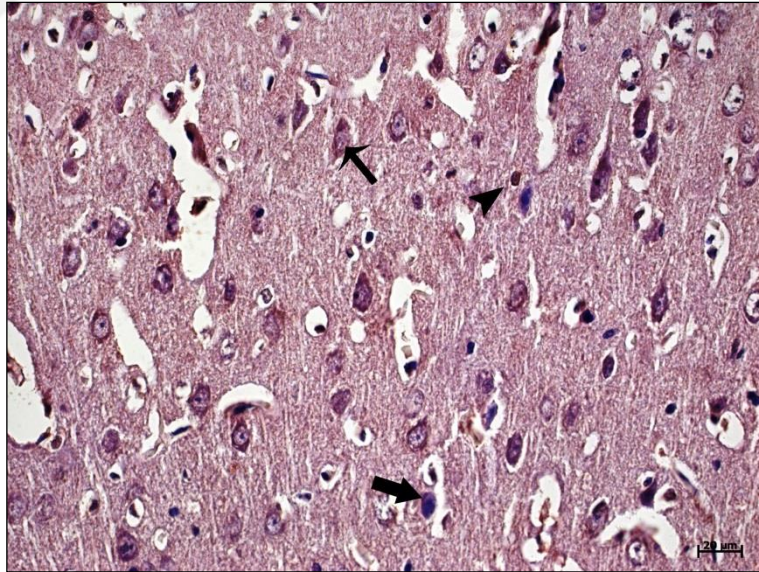
Figür 20: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde Bcl-2 immunohistokimya. Bu grubun özellikle ödemli ve hemorajik beyin doku alanlarında nöronlarda (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) Bcl-2 ekspresyonunda kısmen artış olduğu görüldü. **Boyama:** Bcl-2 immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



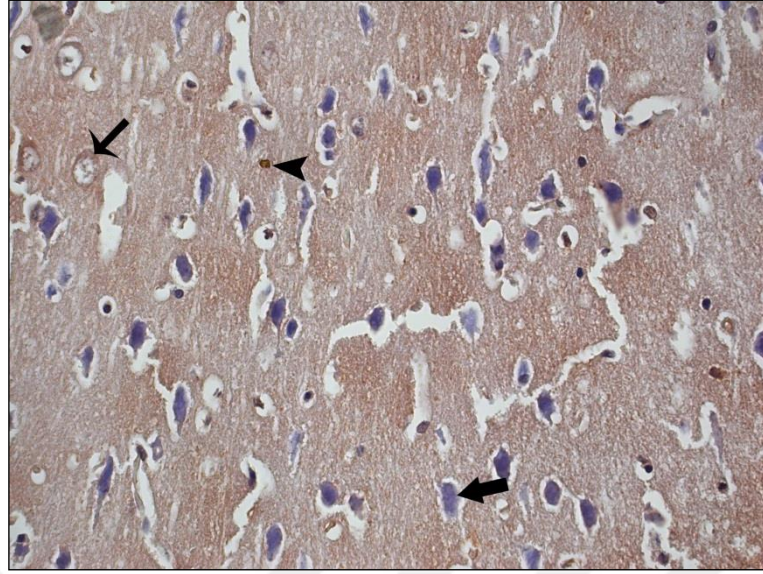
Figür 21: Kontrol grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya. Bazı nöronlarda (ok) ve glialarda (ok başı) immunopozitivitenin kısmen daha yoğun olduğu izlenmesine rağmen bu grubun nöral hücrelerinin (kalın ok) genelinde TNF α düzeyinin oldukça düşük olduğu görüldü. **Boyama:** TNF α immunohistokimya, **Bar:** 20 μm.



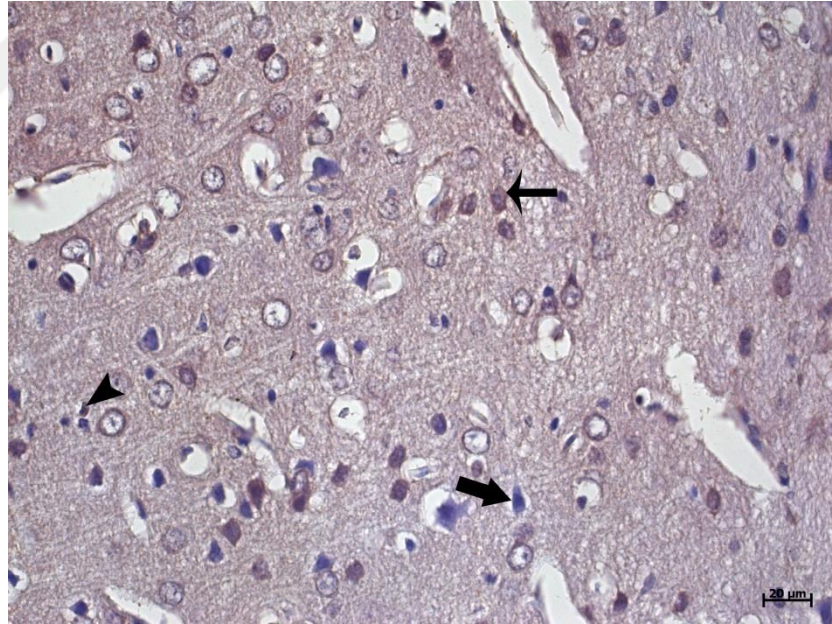
Figür 22: İskemi grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya. İskemi grubu beyin örneklerinde bazı nöronlarda (kalın ok) düşük düzeyde TNF α izlenmesine karşın özellikle fokal ödemli (yıldız) ve serebral hasarın yoğunlaştığı alanlarda bulunan nöron (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) TNF α ekspresyonunda artış olduğu görüldü. **Boyama:** TNF α immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



Figür 23: Resveratrol grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya. Bu grubun beyin kesitlerinde hasar izleri izlenen ve normal morfolojinin olduğu bütün alanlarda TNF α düzeyinin nöronlarda (ok) ve nöroglialarda (ok başı) azalmış olduğu ayrıca nöral hücrelerin bir kısmında (kalın ok) kontrol grubuna yakın düzeyde TNF α varlığı izlendi. **Boyama:** TNF α immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



Figür 24: Urapidil grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) yoğun TNF α mevcudiyetinin yanı sıra bazı nöral hücrelerde (kalın ok) TNF α ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu görüldü. **Boyama:** TNF α immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.



Figür 25: Resveratrol + Urapidil grubu beyin kesitinde TNF α immunohistokimya. Nöronlarda (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) çok düşük düzeyde TNF α eksprese edildiği bunun yanı sıra nöral hücrelerin genelinde (kalın ok) kontrol grubuna benzer düzeyde TNF α varlığı görüldü. **Boyama:** TNF α immunohistokimya, **Bar:** 20 μ m.

6. TARTIŞMA

İnmelerin yaklaşık olarak %88'ini iskemik inmeler oluşturur. İskemik inmelerin de yaklaşık olarak %70' ini orta serebral arter(MCA) tıkanıklığına bağlı gelişir. Biz de çalışmamızı orta serebral arter oklüzyonu (MCAo) modeli üzerinde gerçekleştirdik. İskemik inmede tedavinin ana hedefi penumbradır. Çünkü bu alanın hipoperfüzyonu düzeltildiği takdirde penumbradaki hücreler fonksiyonlarını geri kazanabilirler. Bu amaçla günümüzde nöroptoteksiyon ve rekanalizasyon tedavileri öne çıkmaktadır. Akut iskemik inme tedavisinde rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rtPA) ile tromboliz onaylanan tek medikal tedavi yöntemidir. rtPA' nın iskemik inmede ilk 4,5 saatte yapılabilmesi nedeniyle hastaların ancak %5'inde kullanılabilmektedir(64). Bu nedenle kullanımı daha geniş olan tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda sempatolitik bir antihipertansif olup aynı zamanda al-adrenoseptör antagonisti olup 5-HT1A reseptör agonisti olarak aktivite gösteren urapidil ve daha önceden antioksidan özellikleri kanıtlanmış olan resveratrolün tek başına ve kombineli terapötik etkisini araştırdık.

Serebral iskemide klinik yaklaşımlar yetersiz kaldığından farklı tedavi yöntemleri araştırılmış ancak optimal bir tedavi protokolü henüz geliştirilememiştir. Bugüne kadar yapılan farklı tedavi araştırmaları konunun önemini ortaya koymakta ve bu çalışmaların büyük bir kısmı serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı fitoterapötik ya da sentetik kimyasal bileşenlerin koruyucu etkisini araştırmıştır. Beyin iskemisinde medikal tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik ilk çalışmalar oldukça eskilere dayanmaktadır. Yakın geçmişte Vakili ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada doğal bir karotenoid bileşen olan krosin'in serebral iskemide koruyucu etkisi araştırılmış ve araştırmacılar bu çalışmada krosin'in düşük dozlarda dahi beyinde iskemiyeye bağlı oluşan oksidatif stresi azalttığı ve enfarkt hacmini küçülttüğünü raporlamışlar(65). Xue ve ark.'larının yaptığı başka bir araştırmada ise takviye besin gıdası şeklinde ticari olarak üretilen ve astaksantin'in ratlarda tekrarlı serebral iskemi ve reperfüzyon üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmada ratların tekrarlı serebral iskemi reperfüzyona maruz kalması halinde kognitif fonksiyonların bozulduğu,

dokularda oksidatif stresin şekillendiği, nöronların ultrastrüktürel yapılarında bozulmalar ve sinir doku hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu çalışmada astaksantin tedavisi uygulanan hayvanlarda patolojik değişikliklerin ve kognitif bozuklukların anlamlı derecede ortadan kalktığı gösterilmiştir(66). İlaçla iskemi-reperfüzyona bağlı beyin ve nöral hasarı ortadan kaldırmak için yapılan çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Bunlardan bir tanesi de Peerless ve ark. tarafından yapılan serebral iskemi hasarında Fluosol-DA olarak tanımlanan perflorokarbon bazlı sentetik oksijen ve karbondioksit taşıyıcı sentetik kan kullanılmıştır(67). Araştırmacılar bu çalışmada beyin iskemisi oluşturdıkları hayvanlarda Fluosol-DA'nın iskemik beyin hasarını azalttığını kanıtlamışlar. Araştırmacılar ayrıca bu bulguların Fluosol-DA'nın iskemik vasküler yapıların dışındaki mikrovasküler yapıların aktivitesini arttırarak beyni koruduğunu öne sürmüştür. Miao ve ark. tarafından yapılan başka bir serebral iskemi reperfüzyon hasar çalışmasında klorojenik asidin fokal serebral koruyucu etkisi araştırılmıştır(68). Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda klorojenik asidin inflammatuvar ve hipoksik faktörler ile sinir büyüme faktörleri üzerinden fokal serebral hasarı ortadan kaldırdığını göstermiştir. Miao ve ark. bu çalışmada hipotezlerini her ne kadar hipoksik ve inflammatuvar belirteçler üzerinden geliştirmiş olsa da, yapılan çalışmalar genellikle beyin iskemisinde vasküler sistemin desteklenmesi, iskemik bölgeye oksijenin ulaşması ve metabolik atıkların bölgeden uzaklaştırılması stratejisine dayanmaktadır. Bu nedenle beyin iskemi ve reperfüzyon hasarıyla ilgili yapılan son dönem araştırmaları genellikle vasodilatör potansiyeli olan, mikrovasküler yapılar üzerinden iskemik alanın oksijenizasyonunu amaçlayan çalışmalar olmuştur(69). Zhao ve ark. yaptıkları bir çalışmada Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu iskemik hasara karşı koruyucu olduğunu sitokrom c ve kaspaz 3'ü inhibe ettiğini ancak Bax ekspresyonunu etkilemediğini göstermişlerdir(70). Linnik ve ark. serebral kortekse Bcl-2 enjekte edildikten 24 saat sonra MCA ve aynı taraf karotis kommunis kalıcı olarak oklüde etmiştir. Oklüzyondan 24 saat sonra trifeniltetrazolyum klorür ile boyanarak iskemik alanlar gösterilmiş. Sonuç olarak egzojenik Bcl-2'nin dahi nöronları iskemiyeye karşı koruduğunu gösterilmiştir(71). Hou Y ve ark.

yaptıkları bir çalışmada MCAo modelinde resveratrolün nöroprotektif olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada Hou Y ve ark. Western blot yöntemini kullanarak Bax ve kaspaz 3'ün önemli ölçüde düştüğünü Bcl-2 ekspresyonunun ise arttığını göstermişlerdir. Apoptotik hücreleri göstermek için apoptotik hücrelerdeki DNA fragmentasyonlarını tespit etmek için TUNEL Assay yöntemi kullanılmaktadır. Hou Y ve ark.'nın bu deneyi sonucunda iskemi grubunda çok sayıda TUNEL pozitif nöron varlığı gösterilmiş, buna karşın iskemi sonrası resveratrol verilen grupta ise TUNEL pozitif nöron sayısında anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular resveratrolün serebral iskemide apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir(72). Yaptığımız literatür taramasında resveratrol'ün serebral iskemi / reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceğine yönelik bazı sonuçlara ulaşmış olsak ta bir semptomatik bir antihipertansif olup vazodilatör aktivitesi olan urapidil'in serebral iskemi/reperfüzyon hasarına etkisini araştıran bir çalışmaya ulaşamadık. Daha önce Sinha ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MCAo modeliyle serebral iskemi oluşturup hayvanlara 21 gün resveratrol tedavisi verilmiş. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda resveratrolün serebral iskemi – reperfüzyonun neden olduğu doku lipid peroksidasyonunu hafiflettiği ve beyin hasarını azalttığını ortaya koymuşlar. Her ne kadar urapidil serebral iskemi reperfüzyon çalışmaları olmasa da ratlarda yapılan akut over torsiyon/detorsiyon sonrası tek doz urapidil tedavisi sonucunda hücre hasarına neden olan reaktif oksijen radikallerini(ROS) azaltıp ROS'a karşı koruyucu olan süperoksit dismutaz(SOD) ve antioksidan sistemi temsil eden total antioksidan durum(TAS)'u artırarak torsiyon/detorsiyon hasarına karşı yumurtalığı koruyucu etkisinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir(73). Mustafa can güler ve ark. farelerde bilateral ovaryan arter ve venler, fallop tüpleri ve overleri saat yönünde 360 derece döndürüp torsiyone edip mikrovasküler klemplerle kan akışını 3 saat durdurdular. Daha sonra detorsiyon periyodunda klempler açılarak kan akışı sağlandı. Detorsiyondan hemen önce 5mg/kg tek doz urapidil intraperitoneal yapıldı. Urapidil yapılan grupta ROS'un dolaylı bir göstergesi olan lipid peroksidasyon ürünü olan monoaldehit(MDA)' ve total oksidan durum(TOS)'da azalma, SOD ve

TAS'ta artış gözlemlendi(74).

Biz de literatürde gördüğümüz bu boşluktan dolayı MCAo modelinde serebral iskemi-reperfüzyon hasarında urapidilin tek başına ve resveratrol ile kombine tedavisindeki etkilerini araştırdık. Çalışmamızda iskemi oluşturup ilaç verilmeyen grupla iskemi sonrası urapidil, resveratrol ve urapidil + resveratrol verilen grupları histolojik ve immunohistokimyasal yönden karşılaştırdık.

Hematoksilen & eozin ile boyanan İskemi grubunda kan beyin bariyerinin yıkıldığı, nöronlarda ve glial hücrelerde piknotik çekirdeklerin yoğun miktarda olduğu görüldü. Ayrıca yoğun bir şekilde perinöral ödem de izlendi. İskemi grubunda ayrıca fokal ve diffuz kanama alanları da tespit edildi. Resveratrol grubunda beyin korteksinde, nöron ve glial hücrelerde yer yer izlenen piknotik çekirdek görüntüsüne rağmen dokunun genelinde kontrol grubuna yakın bir morfolojik görüntü izlendi. Nöroglialar yine genel olarak kontrol grubuna benzer şekildeydi. Urapidil grubu iskemi grubuyla karşılaştırıldığında subaraknoid kanama alanları ve kan dokusunun yer yer beyin dokusuna göçünün azaldığı görüldü. Ayrıca nöron ve nöroglialarda gözlenen piknotik çekirdekli hücreler miktarında belirgin bir azalma izlendi. Bu grupta morfolojinin kontrol grubuna yakın bir görüntüye sahip olduğu görüldü. Sinir lifleri arasındaki ödemin iskemi grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalma gösterdiği görüldü. Resveratrol ve urapidil kombine tedavisi uyguladığımız grupta subaraknoid kanama izlerinin neredeyse tamamen ortadan kalktığı, beyin dokusuna geçen kan doku hücrelerinin büyük oranda ortadan kalktığı görüldü. Bu grupta nöron ve nöroglialarda yer yer gözlenen piknotik çekirdekli hücreler haricinde hücrelerin ve morfolojinin kontrol grubuna oldukça benzer bir görüntüye sahip olduğu görüldü.

İmmunohistokimyasal incelemede antiapoptotik protein olan Bcl-2, apoptoziste düzenleyici enzim olan kaspaz 3 ve proinflamatuvar sitokin olan TNF- α düzeylerini inceledik. Kontrol grubunda nöronlarda ve nöroglialarda kaspaz 3, Bcl-2 ve TNF- α düzeylerinin oldukça düşük olduğu görüldü. İskemi grubunda nöronlarda ve nöroglialarda kaspaz 3 düzeyinin çok yüksek; Bcl-2 düzeyinin ise düşük olduğu, TNF- α ekspresyonunda artış olduğu görüldü.

Resveratrol grubunda nöronlarda ve nöroglialarda kaspaz 3 yoğunluğu kontrol grubuna daha yakın; Bcl-2 ve TNF- α ekspresyonunun ise düşük düzeyde olduğu görüldü. Urapidil grubunda kaspaz 3 yoğunluğunun iskemi grubuna göre azaldığı ancak fokal alanlarda bazı nöronlarda ve glia hücrelerinde kaspaz 3 immunopozitifliğinin yoğun olduğu; Bcl-2 düzeyi genel olarak oldukça düşük olmasına rağmen bazı nöronlarda Bcl-2 ekspresyonunun diğer gruplara göre artış eğiliminde olduğu görüldü. TNF- α düzeyi nöronlarda ve glia hücrelerinde yoğun olmasının yanı sıra bazı nöral hücrelerde TNF- α ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu görüldü. Resveratrol + urapidil tedavisi uygulanan grupta dokunun genelinde nöronlarda ve nöroglialarda kaspaz 3 düzeyinin kontrol grubuna çok yakın olduğu; özellikle ödemli ve hemorajik beyin doku alanlarında Bcl-2 ekspresyonunda kısmen artış olduğu; TNF- α düzeyinin ise çok düşük eksprese edildiği görüldü görüldü.

Bu bulgular değerlendirildiğinde güçlü bir sempatolitik bir antihipertansif olup aynı zamanda α 1-adrenoseptör antagonisti olup 5-HT1A reseptör agonisti olarak aktivite gösteren vazodilatatör olan urapidil'in tek başına kullanılması iskemik inmeye karşı etkili olabileceği ancak antioksidan özelliği iyi bilinen resveratrol ile kombine bir şekilde kullanılmasıyla iskemik inmenin medikal tedavisinde daha etkili olabileceği sonucuna ulaştık.

7. SONUÇ

Orta serebral arter oklüzyon(MCAo) modeli kullanılarak iskemi oluşturulan ratlarda literatürde deneysel serebral iskemide koruyucu ortaya konulan resveratrol ile güçlü bir sempatolitik bir antihipertansif olup vazodilatatör olan urapidil'in hem öz hem de kombine tedavisindeki protektif etkisini inceledik. Sonuçlarımız resveratrolün literatüre uyumlu şekilde protektif bir bileşen olduğunu göstermektedir. Bunu sağlarken güçlü antioksidan kapasitesinin olduğunu göstermektedir. Urapidil tedavisi uyguladığımız hayvanlarda da durum resveratrol grubuna benzer nitelikteydi. Ancak her iki ilacın da uygulandığı gruptaki hayvanlarda nöroprotektif etki çok daha başarılıydı. Bu elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda resveratrol ve urapidil'in kombine tedavisinin serebral MCAo olgularında klinik müdahale öncesinde destekleyici bir tedavi olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak her ne kadar elde ettiğimiz bulgular gözle görülür bir koruyucu etkinlik sağlasa da deneysel çalışmaların kliniğe uyarlanabilmesi için çok daha fazla sayıda hayvanın ve çok daha sayıda dozun test edildiği yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009;111(6):483-495. doi:10.1016/j.clineuro.2009.04.001
2. Donkor ES, 2018. 21(st) Yüzyılda İnme: Yükün, Epidemiyolojinin ve Yaşam Kalitesinin Anlık Görüntüsü. *Stroke Res Treat* 2018, 3238165.
3. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW ve ark. . Kalp hastalığı ve inme İstatistikleri-2018 güncellemesi: Amerikan Kalp Derneği'nden bir rapor. *Sirkülasyon* _ 2018; 137 (12):e67-e492.
4. Gooch CL, Pracht E, Borenstein AR. Amerika Birleşik Devletleri'nde nörolojik hastalığın yükü: bir özet rapor ve harekete geçirme çağrısı. *Ann Neurol.* 2017; 81 (4): 479-484.
5. Adams HP Jr. Bendixen BH, Kappelle LJ, *et al* Akut iskemik inmenin alt tipinin sınıflandırılması. Çok merkezli bir klinik çalışmada kullanım için tanımlar. Akut İnme Tedavisinde Org 10172 Denemesi. *İnme* 1993; 24:35-41
6. Brown RD, Whisnant JP, Sicks RD, et al. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 1996;27:373-380
7. Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, et al. Secular trends in stroke incidence and mortality: the Framingham Study. *Stroke* 1992;23: 1551-1555
8. Kapral MK, Fang J, Hill MD, et al. Sex differences in stroke care and outcomes: results from the Registry of the Canadian Stroke Network. *Stroke.* 2005;36(4):809-814.
9. Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF; ISGS investigators. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke.* 2008;39(5):1586-1589.
10. Elkind MS, Sacco RL. Stroke risk factors and stroke prevention. *Semin Neurol.* 1998;18(4):429-440. doi:10.1055/s-2008-1040896
11. Allen CL, Bayraktutan U. Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke.* 2008;3(2):105-116. doi:10.1111/j.1747-4949.2008.00187.
12. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7609. Published 2020 Oct 15.
13. Love BB, Biller J, Jones MP, Adams HP Jr, Bruno A. Cigarette smoking. A risk factor for cerebral infarction in young adults. *Arch Neurol.* 1990;47(6):693-698.
14. Hindy G, Engström G, Larsson SC, et al. Role of Blood Lipids in the Development of Ischemic Stroke and its Subtypes: A Mendelian Randomization Study. *Stroke.* 2018;49(4):820-827.

15. Palomäki H, Kaste M. Regular light-to-moderate intake of alcohol and the risk of ischemic stroke. Is there a beneficial effect?. *Stroke*. 1993;24(12):1828-1832.
16. Hillbom M, Numminen H, Juvela S. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. *Stroke*. 1999;30(11):2307-2312.
17. Kamalian S, Lev MH. Stroke Imaging. *Radiol Clin North Am*. 2019;57(4):717-732.
18. Puetz V, Sylaja PN, Coutts SB, Hill MD, Dzialowski I, Mueller P, Becker U, Urban G, O'Reilly C, Barber PA, Sharma P, Goyal M, Gahn G, von Kummer R, Demchuk AM (2008) BT anjiyografi kaynak görüntülerindeki hipoatenüasyonun boyutu, baziler arter oklüzyonu olan hastalarda fonksiyonel sonucu tahmin eder. *Strok* 39:2485–2490
19. Rymer MM, Summers D. Ischemic stroke: prevention of complications and secondary prevention. *Mo Med*. 2010;107(6):396-400.
20. Lin MP, Liebeskind DS. Imaging of Ischemic Stroke. *Continuum (Minneap Minn)*. 2016;22(5, Neuroimaging):1399-1423. doi:10.1212/CON.0000000000000376
21. Chugh C. Acute Ischemic Stroke: Management Approach. *Indian J Crit Care Med*. 2019;23(Suppl 2):S140-S146.
22. Derex L, Cho TH. Mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *Rev Neurol (Paris)*. 2017;173(3):106-113.
23. Hun K., Silav G., Ugur H.Ç., Unlu A. . Serebral metabolizma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2001; 54(1), 51-56.
24. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med*. 2011;2011:823525.
25. Edvinsson L, MacKenzie E, McCulloch J. *Serebral Kan Akışı ve Metabolizma*. New York, NY, ABD: Raven Press; 1993.
26. Daha sert DR. Kedi serebral arterlerinin basınca bağlı miyojenik aktivasyonu, sağlam endotelyuma bağlıdır. *Dolaşım Araştırması*. 1987; 60 (1):102–107.
27. Nielsen AN, Lauritzen M. Sıçan somatosensör korteksinde nöronal aktivite ve kan akışının aktiviteye bağlı artışlarının birleştirilmesi ve ayrılması. *Fizyoloji Dergisi*. 2001; 533 (3):773-785.
28. Paulson OB, Newman EA. Astrosit uç ayaklarından potasyum salınımı beyin kan akışını düzenler mi? *bilim _* 1987; 237 (4817):896-898.
29. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. Düz kasta ATP'ye duyarlı ve içe doğru rektifiye edici potasyum kanalları. *Fizyolojik İncelemeler*. 1997; 77 (4):1165-1232.
30. Waeber C, Moskowitz MA. İnflamatuar bir hastalık olarak migren. *Nöroloji*. 2005; 64 (10):S9–S15.
31. Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P, Hamel E. Beyin mikrosirkülasyonunun düzenlenmesinde Serotonin. *Nörobiyolojide İlerleme*. 1996; 50 (4):335–362.

32. Iadecola C. Normal beyinde ve Alzheimer hastalığında nörovasküler düzenleme. *Doğa İncelemeleri Sinirbilim*. 2004; 5 (5):347–360.
33. Iliff JJ, D'Ambrosio R, Ngai AC, Winn HR. Adenozin reseptörleri, sıçan serebral korteksinde glutamatla uyarılmış arteriolar genişlemeye aracılık eder. *Amerikan Fizyoloji Dergisi*. 2003; 284 (5):H1631–H1637.
34. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):483-495.
35. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):483-495.
36. Brouns R, Sheorajpanday R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. *Clin Chim Acta*. 2008;397(1-2):27-31.
37. Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol*. 2009;61(6):321-330.
38. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017;38(7):1167- 1186.
39. Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress-- assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012;50(3):219-230.
40. Che Y, Wang JF, Shao L, Young T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. *J Psychiatry Neurosci*. 2010;35(5):296-302.
41. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*. 1999;9(1):119-131.
42. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173-185.
43. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995;26(11):2120-2126.
44. Dohmen C, Bosche B, Graf R, et al. Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 2007;38(1):56-61.
45. Green D. Coagulation cascade. *Hemodial Int*. 2006;10 Suppl 2:S2-S4.
46. Harshfield EL, Sims MC, Traylor M, Ouwehand WH, Markus HS. The role of haematological traits in risk of ischaemic stroke and its subtypes [published correction appears in Brain. 2020 Mar 1;143(3):e24]. *Brain*. 2020;143(1):210-221.
47. D'Orsi B, Mateyka J, Prehn JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int*. 2017;109:162-170.
48. Sheng R, Liu XQ, Zhang LS, et al. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy*. 2012;8(3):310-325.

49. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*. 2003;34(1):214-223.
50. Mhairi Macrae I. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*. 1992;34(4):302-308. doi:10.1111/j.1365-2125.1992.tb05634.x
51. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):34-66. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.11.003
52. Ito U. , Fieschi C. , Orzi F., Kuroiwa T., Klatzo I. Maturation phenomenon in cerebral ischemia 3: defense mechanisms versus apoptosis neuronal recovery and protection in cerebral infarction. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999
53. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000;106(7):829-838. doi:10.1172/JCI9369
54. Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, et al. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*. 2006;201(2):324-334.
55. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3445-3454. Published 2015 Jul 2.
56. Kofler J, Hattori K, Sawada M, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods*. 2004;136(1):33-44.
57. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979;10(3):267-272.
58. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44(2):85-95.
59. Ross DT, Duhaime AC. Degeneration of neurons in the thalamic reticular nucleus following transient ischemia due to raised intracranial pressure: excitotoxic degeneration mediated via non-NMDA receptors?. *Brain Res*. 1989;501(1):129-143.
60. Hou Y, Wang K, Wan W, Cheng Y, Pu X, Ye X. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats. *Genes Dis*. 2018;5(3):245-255. Published 2018 Jun 15.
61. Hong JH, Lee H, Lee SR. Protective effect of resveratrol against neuronal damage following transient global cerebral ischemia in mice. *J Nutr Biochem*. 2016;27:146-152.
62. Fang L, Gao H, Zhang W, Zhang W, Wang Y. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3219-3226.

63. Zhou ZX, Mou SF, Chen XQ, Gong LL, Ge WS. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- κ B in animal models of acute pharyngitis. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):1269-1274.
64. Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:161-169.
65. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, et al. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation*. 2011;123(7):750-758.
66. Vakili, A., Einali, M. R., & Bandegi, A. R. (2014). Protective effect of crocin against cerebral ischemia in a dose-dependent manner in a rat model of ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(1), 106-113.
67. Xue, Y., Qu, Z., Fu, J., Zhen, J., Wang, W., Cai, Y., & Wang, W. (2017). The protective effect of astaxanthin on learning and memory deficits and oxidative stress in a mouse model of repeated cerebral ischemia/reperfusion. *Brain research bulletin*, 131, 221-228.
68. Peerless, S. J., Ishikawa, R., Hunter, I. G., & Peerless, M. J. (1981). Protective effect of Fluosol-DA in acute cerebral ischemia. *Stroke*, 12(5), 558-563.
69. Miao, M., Cao, L., Li, R., Fang, X., & Miao, Y. (2017). Protective effect of chlorogenic acid on the focal cerebral ischemia reperfusion rat models. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(4), 556-563.
70. Sun, Y. Xu, D. P., Qin, Z., Wang, P. Y., Hu, B. H., Yu, J. G., ... & Liu, X. (2018). Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on ischemic stroke. *European journal of pharmacology*, 818, 604-609.
71. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem*. 2003;85(4):1026-1036.
72. Linnik MD, Zahos P, Geschwind MD, Federoff HJ. Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1995;26(9):1670-1675.
73. Hou Y, Wang K, Wan W, Cheng Y, Pu X, Ye X. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats. *Genes Dis*. 2018;5(3):245-255. Published 2018 Jun 15.
74. Güler, M. C., Tanyeli, A., Erdoğan, D. G., Eraslan, E., Çomaklı, S., Polat, E., & Doğanay, S. (2021). Urapidil alleviates ovarian torsion detorsion injury via regulating oxidative stress, apoptosis, autophagia, and inflammation. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(7), 935.

